

**Die Konzentration der Glucocorticoid- und
Schilddrüsenhormone im Blut männlicher Tupajas
(Tupaia belangeri)
unter Kontroll- und Stressbedingungen**

Monika Düren

1977

Die Konzentration der Glucocorticoid- und Schilddrüsenhormone

im Blut männlicher Tupajas (*Tupaia belangeri*)

unter Kontroll- und Stressbedingungen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Monika Düren
aus Mechernich
1977

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Autrum

2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Linzen

Tag der mündlichen Prüfung: 6.7.1977



Herrn Professor Dr. D. von Holst möchte ich sehr für die Überlassung des Themas, für sein stetes Interesse und anregende Diskussionen danken.

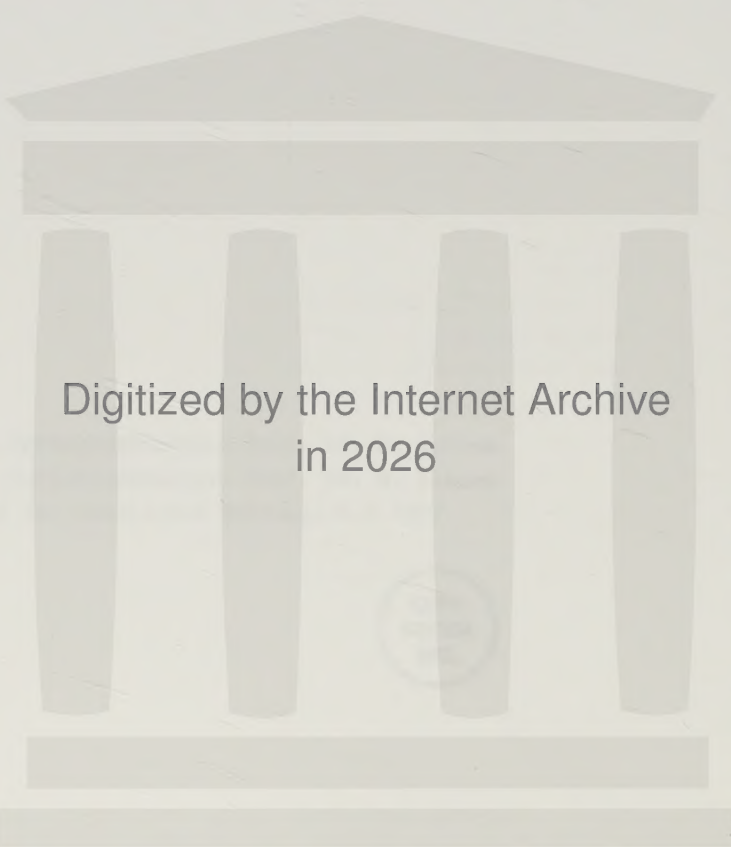
I. Einleitung	1
II. Hauptteil	2
1. Einleitung	2
2. Hauptteil	3
3. Schluss	4
4. Literaturverzeichnis	5
5. Zusammenfassung	6

III. Ergebnisse	7
1. Ergebnisse	7
2. Ergebnisse	8
3. Ergebnisse	9
4. Ergebnisse	10
5. Ergebnisse	11
6. Ergebnisse	12
7. Ergebnisse	13
8. Ergebnisse	14
9. Ergebnisse	15
10. Ergebnisse	16

IV. Zusammenfassung	17
1. Zusammenfassung	17
2. Zusammenfassung	18
3. Zusammenfassung	19
4. Zusammenfassung	20
5. Zusammenfassung	21
6. Zusammenfassung	22
7. Zusammenfassung	23
8. Zusammenfassung	24
9. Zusammenfassung	25
10. Zusammenfassung	26

V. Literaturverzeichnis	27
-------------------------	----

VI. Zusammenfassung	28
---------------------	----



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0054

A.	E I N L E I T U N G	1
B.	M A T E R I A L U N D M E T H O D E N	4
I.	Versuchstiere	4
II.	Blutentnahme	4
III.	Hormonbestimmungen	5
	a) Verwendete Materialien	5
	b) Bestimmungsmethoden	7
	c) Auswertung	9
	d) Liste der Abkürzungen	10
C.	E R G E B N I S S E	12
I.	Hormonbestimmungen	12
	a) Glucocorticoide	12
	b) Schilddrüsenhormone	15
II.	Die Hormonspiegel im Blut und ihre Veränderungen	19
	a) Basalwerte	19
	b) Tagesperiodische Schwankungen	22
	c) Kurzzeitstress	25
	d) Sozialer Dauerstress	28
D.	D I S K U S S I O N	35
I.	Bewertung der Hormonbestimmungen	35
II.	Bewertung der Hormonspiegel und ihrer Veränderungen	37
E.	Z U S A M M E N F A S S U N G	42
F.	L I T E R A T U R	44

A. E I N L E I T U N G

Unter normalen Bedingungen hält der Organismus von Säugertieren seine Homöostase durch ein kompliziertes Zusammenspiel hormoneller und nervöser Prozesse aufrecht. Auf Belastung der verschiedensten Art reagiert er nicht nur mit reizspezifischen, sondern auch mit einer Reihe von unspezifischen Reaktionen, die seine allgemeine Widerstandsfähigkeit erhöhen sollen und die Selye (1950) als das "allgemeine Anpassungssyndrom" bezeichnet hat.

Eine der wichtigsten Veränderungen ist nach Selye die erhöhte Abgabe von Nebennierenrindenhormonen, die wegen ihrer Wirkung auf den Kohlehydrat- und Mineralstoffwechsel zur Anpassung an eine Belastung notwendig sein sollen.

Ebenso sollte die Abgabe der Schilddrüsenhormone in derartigen aktivierenden (ergotropen) Situationen erhöht sein, da diese katabole Prozesse fördern.

Die Befunde über die Schilddrüsenfunktion unter Belastung sind jedoch widersprüchlich. Man findet sowohl eine Abnahme als auch eine Zunahme der Schilddrüsenaktivität. In einer Zusammenfassung stellt Selye (1976) fest: Eine Auswirkung von Stress auf die Schilddrüsenaktivität ist zwar nachzuweisen, jedoch sind Intensität und Richtung so unterschiedlich, daß zur Zeit keine Generalisierung möglich ist.

Viele der Widersprüche dürften methodisch bedingt sein. Die ersten Aussagen über hormonelle Veränderungen (vor 1950) beruhen auf morphologischen Untersuchungen der Hormondrüsen, die eine funktionelle Aussage nicht ohne weiteres zulassen.

Die ersten Methoden (PBI;BEI), die dann zur Bestimmung der Hormonkonzentrationen im Blut eingesetzt wurden, waren unspezifisch. Die Bestimmung von proteingebundenem Jod (PBI) erfaßt außer dem Hormonjod (Thyroxin und Trijodthyronin) auch andere jodierte Eiweiße und Tyrosine sowie anorganisches Jod. Die Bestimmung von butanolextrahierbarem Jod (BEI) schließt zwar eine Verfälschung durch anorganisches

Jod aus, erfaßt aber das gesamte organisch gebundene Jod und nicht nur das Hormonjod. Die so gemessenen Zu- oder Abnahmen geben daher nicht unbedingt eine entsprechende Änderung der Hormonspiegel wieder. Konzentrationsschwankungen der anderen jodierten Bestandteile des Blutes können bis zu 50% der Werte betragen (Sterling, 1974). Physiologisch bedeutsame Veränderungen des Schilddrüsenhormongehaltes können durch diese störenden Einflüsse verdeckt werden.

Seit einigen Jahren ermöglicht die Entwicklung der kompetitiven Proteinbindungsanalyse eine exaktere Untersuchung der hormonellen Reaktionen eines Organismus. Diese Methode beruht auf der Verdrängung des endogenen Hormons aus seiner Eiweißbindung durch radioaktiv-markiertes Hormon gleicher Affinität zum Trägerprotein. Hiermit ist die Bestimmung der Gesamtkonzentrationen der Glucocorticoid- und Schilddrüsenhormone möglich.

Allerdings lassen sich die verschiedenen Nebennierenrindenhormone ebenso schwierig getrennt bestimmen wie die beiden Schilddrüsenhormone. Für die Glucocorticoide ist dies ohne wesentliche Bedeutung, da sie eine etwa gleiche Wirkung auf den Stoffwechsel haben. Die beiden Schilddrüsenhormone Thyroxin und Trijodthyronin unterscheiden sich hingegen deutlich in ihrer Wirkung. Das im Blut vorherrschende Thyroxin hat offensichtlich keine stoffwechselphysiologische Bedeutung, sondern dient nur als Prohormon für die Bildung von Trijodthyronin (Pfannenstiel, 1974; van Middlesworth, 1974; Sterling, 1974).

Das eigentlich stoffwechselaktive Trijodthyronin liegt in sehr geringer Konzentration im Blut vor (beim Menschen weniger als 3% der gesamten Schilddrüsenhormonkonzentration). Eine getrennte Bestimmung von Thyroxin und Trijodthyronin ist erst seit kurzem durch radioimmunologische Analysen (RIA) möglich. Die Hormone werden hierbei an Antikörper gebunden, deren Kreuzreaktion mit ähnlichen Hormonen sehr gering ist.

A. E I N L E I T U N G

Unter normalen Bedingungen hält der Organismus von Säugtieren seine Homöostase durch ein kompliziertes Zusammenspiel hormoneller und nervöser Prozesse aufrecht. Auf Belastung der verschiedensten Art reagiert er nicht nur mit reizspezifischen, sondern auch mit einer Reihe von unspezifischen Reaktionen, die seine allgemeine Widerstandsfähigkeit erhöhen sollen und die Selye (1950) als das "allgemeine Anpassungssyndrom" bezeichnet hat.

Eine der wichtigsten Veränderungen ist nach Selye die erhöhte Abgabe von Nebennierenrindenhormonen, die wegen ihrer Wirkung auf den Kohlehydrat- und Mineralstoffwechsel zur Anpassung an eine Belastung notwendig sein sollen.

Ebenso sollte die Abgabe der Schilddrüsenhormone in derartigen aktivierenden (ergotropen) Situationen erhöht sein, da diese katabole Prozesse fördern.

Die Befunde über die Schilddrüsenfunktion unter Belastung sind jedoch widersprüchlich. Man findet sowohl eine Abnahme als auch eine Zunahme der Schilddrüsenaktivität. In einer Zusammenfassung stellt Selye (1976) fest: Eine Auswirkung von Stress auf die Schilddrüsenaktivität ist zwar nachzuweisen, jedoch sind Intensität und Richtung so unterschiedlich, daß zur Zeit keine Generalisierung möglich ist.

Viele der Widersprüche dürften methodisch bedingt sein. Die ersten Aussagen über hormonelle Veränderungen (vor 1950) beruhen auf morphologischen Untersuchungen der Hormondrüsen, die eine funktionelle Aussage nicht ohne weiteres zulassen.

Die ersten Methoden (PBI;BEI), die dann zur Bestimmung der Hormonkonzentrationen im Blut eingesetzt wurden, waren unspezifisch. Die Bestimmung von proteingebundenem Jod (PBI) erfaßt außer dem Hormonjod (Thyroxin und Trijodthyronin) auch andere jodierte Eiweiße und Tyrosine sowie anorganisches Jod. Die Bestimmung von butanolextrahierbarem Jod (BEI) schließt zwar eine Verfälschung durch anorganisches

Jod aus, erfaßt aber das gesamte organisch gebundene Jod und nicht nur das Hormonjod. Die so gemessenen Zu- oder Abnahmen geben daher nicht unbedingt eine entsprechende Änderung der Hormonspiegel wieder. Konzentrationsschwankungen der anderen jodierten Bestandteile des Blutes können bis zu 50% der Werte betragen (Sterling, 1974). Physiologisch bedeutsame Veränderungen des Schilddrüsenhormongehaltes können durch diese störenden Einflüsse verdeckt werden.

Seit einigen Jahren ermöglicht die Entwicklung der kompetitiven Proteinbindungsanalyse eine exaktere Untersuchung der hormonellen Reaktionen eines Organismus. Diese Methode beruht auf der Verdrängung des endogenen Hormons aus seiner Eiweißbindung durch radioaktiv-markiertes Hormon gleicher Affinität zum Trägerprotein. Hiermit ist die Bestimmung der Gesamtkonzentrationen der Glucocorticoid- und Schilddrüsenhormone möglich.

Allerdings lassen sich die verschiedenen Nebennierenrindenhormone ebenso schwierig getrennt bestimmen wie die beiden Schilddrüsenhormone. Für die Glucocorticoide ist dies ohne wesentliche Bedeutung, da sie eine etwa gleiche Wirkung auf den Stoffwechsel haben. Die beiden Schilddrüsenhormone Thyroxin und Trijodthyronin unterscheiden sich hingegen deutlich in ihrer Wirkung. Das im Blut vorherrschende Thyroxin hat offensichtlich keine stoffwechselphysiologische Bedeutung, sondern dient nur als Prohormon für die Bildung von Trijodthyronin (Pfannenstiel, 1974; van Middlesworth, 1974; Sterling, 1974).

Das eigentlich stoffwechselaktive Trijodthyronin liegt in sehr geringer Konzentration im Blut vor (beim Menschen weniger als 3% der gesamten Schilddrüsenhormonkonzentration). Eine getrennte Bestimmung von Thyroxin und Trijodthyronin ist erst seit kurzem durch radioimmunologische Analysen (RIA) möglich. Die Hormone werden hierbei an Antikörper gebunden, deren Kreuzreaktion mit ähnlichen Hormonen sehr gering ist.

Mit diesen Methoden wurden jedoch bisher nur wenige und sehr spezielle Fragen untersucht, vor allem Kälteanpassung, ohne jedoch die Widersprüche zu klären (Wilson et al., 1970; Hefco et al., 1975; Jobin et al., 1976; Tal et al., 1976; Nagata et al., 1976).

Unsere Vorstellungen über die Reaktion der Schilddrüse auf Belastung der verschiedensten Art beruhen daher auch heute noch weitgehend auf Daten, die mit PBI- oder BEI-Methoden gewonnen wurden. Da diese jedoch keine getrennten Aussagen über Konzentrationsänderungen der einzelnen Schilddrüsenhormone im Blut ermöglichen (besonders über Trijodthyronin), müssen derartige Fragen mit den heutigen exakteren Methoden untersucht werden.

Einen Beitrag hierzu soll die vorliegende Arbeit liefern. Sie hatte folgende Ziele:

- 1.) Methoden zur Bestimmung der Gesamtkonzentration der Glucocorticoide sowie von Thyroxin und Trijodthyronin zu erarbeiten.
- 2.) Veränderungen der Konzentrationen der Nebennierenrinden- und Schilddrüsenhormone in akut- und chronisch-belastenden Situationen zu untersuchen.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Versuchstiere

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an adulten männlichen *Tupaia belangeri* vorgenommen. Tupajas sind kleine tagaktive Säugetiere, die in Südostasien beheimatet sind. Ihre systematische Stellung ist ungeklärt; im allgemeinen wird eine Verwandtschaft mit Affen vermutet (Übersicht: Doyle, 1974).

Die Versuchstiere stammten zum Teil aus institutseigener Zucht; zum Teil handelte es sich um Wildfänge, die seit mindestens neun Monaten bei uns eingewöhnt worden waren.

Alle Versuchstiere waren von etwa gleicher Größe und gleichem Gewicht; sie entsprachen in den klinisch-chemischen Parametern (s.u.) den von uns als normal festgelegten Werten. Alle Tupajas wurden einzeln in Käfigen gehalten (Abmessungen: Bodenfläche 50 x 100 cm; Höhe 50 cm). Die Raumtemperatur war ca. 25°C; der Tag-Nachtrhythmus betrug 12:12 Stunden (10 - 22⁰⁰ Uhr: Hellphase); Futter (Altromin-diät für Tupajas) und Wasser waren ad libitum vorhanden (Einzelheiten: v.Holst, 1969).

II. Blutentnahme

Wenn nicht anders angegeben, wurde morgens um 9⁰⁰ Uhr (eine Stunde vor Beginn der Aktivitätsphase) Blut aus dem Schwanz entnommen. Hierbei wurden mittels eines Blut-schnepfers die Arterien und Venen der Schwanzunterseite angeschnitten. Auf diese Weise kann man bei Tupajas je nach Bedarf 0,5 bis 4 ml arterio-venöses Blut innerhalb von weniger als einer Minute erhalten und selbst mehrfach täglich Blut entnehmen, ohne daß wesentliche Veränderungen der Blutzusammensetzung eintreten.

Ein Teil der Tiere wurde durch einen Schnitt durch die linke Carotis getötet. Es wird im weiteren nicht darauf hingewiesen, ob das Blut aus dem Schwanz oder der Hals-

carotis entnommen wurde, da die in dieser Untersuchung interessierenden Parameter unabhängig von der Art der Blutentnahme gleich sind.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden nie mehr als 2 ml Blut entnommen. Jede Blutentnahme war spätestens drei Minuten nach Betreten des Versuchsraumes abgeschlossen (s. auch S. 19).

Neben den Hormonen wurden verschiedene andere klinisch-chemische Parameter bestimmt wie z.B.: Hämoglobin, Gesamteiweiß, Albumin, Kalium, Natrium, Harnstoff-N, Kreatinin, Glucose, Cholesterin, Triglyceride und verschiedene Enzyme.

Die Glucocorticoide und Thyroxin wurden jeweils doppelt bestimmt und die beiden Werte gemittelt. Trijodthyronin wurde einfach gemessen, da die Abweichungen bei Doppelbestimmungen minimal waren (im Mittel $4,4 \pm 1,3\%$; $n = 10$).

III. Hormonbestimmungen

a) Verwendete Materialien

Glucocorticoidbestimmung:

1,2 - ^3H - Cortisol spez. Aktivität 152 mCi/mg,

1,2,6,7 (n) - ^3H - Cortisol spez. Aktivität 258 und 222 mCi/mg, (alle: the Radiochemical Centre, Amersham, England);

Sephadex G-10, Triton X-100 (Roth OHG, Karlsruhe);

PPO (2,5 - Diphenyloxazol), POPOP (2,2 - p - Phenylen - bis (5 - phenyloxazol)), Toluol, Florisil, Methylenchlorid, Hydrocortison Substanz reinst (alle: Firma Merck, Darmstadt);

Norit A (Serva, Heidelberg);

Dextran T 70 (Pharmacia, Uppsala);

Immunglobulin vom Rind (Behringwerke, Marburg);

Antiserum vom Kaninchen⁽¹⁾ (Antikörper gegen das C-21-Hemisuccinat-Rinderserumalbumin-Konjugat des Cortisons),

⁽¹⁾Herrn Dr. Bittlingmeier von der Universitätsklinik München danke ich für die Überlassung des Antikörpers.

Kreuzreaktionen:	Cortisol	100%
	Corticosteron	100%
	11-Desoxycortisol	100%
	17-OH-Progesteron	95%
	Testosteron	8%
	Aldosteron	1%

Thyroxinbestimmung:

Sephadex G-25 superfine, Polyvinylpyrrolidon K 30
(Roth OHG, Karlsruhe);

^{125}Jod -Thyroxin spez. Aktivität 46,5 mCi/mg (the Radio-
chemical Centre, Amersham, England);

L-Thyroxin-Na-Salz $\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ reinst (Serva, Heidelberg);

Riafluor^R (NEN Chemicals, Dreieichenhain);

T_4 -RIA-set (Firma Henning, Berlin⁽²⁾) bestehend aus:
Barbitalpuffer pH 8,4, Dextranaktivkohle, 8-Anilinonaph-
thalin-1-Sulfonsäure;

T_4 -freies Serum, L- T_4 -Standard, T_4 -Kontrollserum;

T_4 -Antiserum vom Kaninchen (Antikörper gegen das Äthylester-
Rinderserumalbumin-Konjugat des Thyroxins),

Kreuzreaktion mit Trijodthyronin $\leq 0,2\%$;

^{125}Jod -Thyroxin 5 $\mu\text{Ci}/0,5\text{ ml}$ spez. Aktivität 500 mCi/mg;

Trijodthyroninbestimmung:

T_3 -RIA-set (Firma Henning, Berlin) bestehend aus:

Barbitalpuffer pH 8,4, Dextranaktivkohle, 8-Anilinonaph-
thalin-1-Sulfonsäure;

T_3 -freies Serum, L- T_3 -Standard, T_3 -Kontrollserum;

T_3 -Antiserum vom Kaninchen (Antikörper gegen das Methylester-
Rinderserumalbumin-Konjugat des Trijodthyronins),

Kreuzreaktion mit Thyroxin $\leq 0,2\%$;

^{125}Jod -Trijodthyronin 5 $\mu\text{Ci}/0,5\text{ ml}$ spez. Aktivität 500 mCi/mg;

(2) Der Firma Henning, Berlin danke ich für die Bereitstellung
des Materials für Thyroxin- und Trijodthyroninbestimmungen.

b) Bestimmungsmethoden

Glucocorticoidbestimmung

Competitive Proteinbindungsanalyse

Die Bestimmung geschah nach der Methode von Horn und Mitarbeitern (1975) in einem halbautomatischen System. Die Reagenzien werden mittels einer Mikropumpe auf Säulen aufgebracht, die in einen Thermoblock mit konstanter Temperatur eingelassen sind. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 0,2 ml in der Minute.

Zu 100 µl Serum werden 100 µl einer ^3H -Cortisolösung (0,55 ng ^3H -Cortisol/100 µl) und 100 µl 0,1 n HCl (pH 1) pipettiert. Dieses Gemisch wird bei +26°C auf saure Säulen (pH 1) mit 5 ml Sephadex G-10 gepumpt. Die Glucocorticoide werden quantitativ am Gel adsorbiert und die Serumproteine mit Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) eluiert und verworfen. 500 µl eines Serums⁽³⁾ (1:30 verdünnt) wird auf die Säulen gepumpt und bindet einen Teil der Hormone, sowohl endogenes als auch radioaktives (Einzelheiten s.S.12). Diese gebundene Phase (B) wird in 20 ml Tritonfluor im Flüssigkeits-Szintillator gezählt (s.S. 9). Der auf der Säule verbleibende freie Anteil der Hormone (F) wird durch 1:3 verdünntes Serum, welches mit Florisil von Steroiden gereinigt wurde, gebunden und mit 0,1 n HCl (pH 1) eluiert und verworfen.

Für die Eichkurve wurden statt 100 µl Serum je 100 µl von Standardlösungen mit steigenden Konzentrationen von 0 bis 16 ng Cortisol/100 µl eingesetzt.

Radioimmunologische Analyse

Die Steroide werden mit 4 ml Dichlormethan aus 50 µl Serum extrahiert, die wasserlöslichen Anteile (Proteine u.a.) bleiben im Überstand (Nieschlag und Wickings, 1975). Aliquots werden eingedampft und in 100 µl Barbitalpuffer (pH 7,2) aufgenommen. Diese Proben werden mit 500 µl einer

⁽³⁾ Das Serum stammte von Schwangeren oder Frauen unter Östrogen-therapie, die einen hohen Anteil bindender Eiweiße im Blut haben (z.B. Transcortin).

1:10 000 verdünnten Antikörperlösung (s.S. 5) und 100 μ l ^3H -Cortisolösung (0,02 ng/100 μ l) zwei Stunden im Eisbad inkubiert.

Endogenes und radioaktives Hormon werden anteilig ihrer jeweiligen Konzentration an den Antikörper gebunden (gebundene Phase = B). Der freie Anteil der Hormone wird mit 500 μ l Kohle-Dextran Suspension bei +4°C digeriert. 1 ml des Überstandes werden in 20 ml Tritonfluor (s.S. 9) gezählt.

Für die Eichkurve wurden je 100 μ l von Standardlösungen mit steigenden Konzentrationen von 0 bis 2 ng Cortisol/100 μ l ohne vorherige Extraktion (s.S.15) inkubiert.

Thyroxinbestimmung

Competitive Proteinbindungsanalyse

Die Bestimmung erfolgte ebenfalls nach der Methode von Horn und Mitarbeitern (1975) im gleichen System wie für die Glucocorticoide beschrieben (s.o.). Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/ Minute.

Das Gemisch aus 100 μ l Serum (oder Standard) 100 μ l ^{125}J -Thyroxinlösung (0,5 ng/100 μ l) und 200 μ l 0,05 n NaOH (pH 10) wird bei +29°C auf alkalische Säulen (pH 10) mit 2 ml Sephadex G-25 superfine aufgebracht. Die Serumproteine werden mit Barbitalspuffer (pH 8,6) eluiert. Mit 500 μ l eines 1:50 verdünnten Serums, welches auch viel Thyroxin-bindendes Globulin enthält (s.S. 7), wird ein Teil der Hormone gebunden und mit Barbitalspuffer (pH 8,6) eluiert. Diese gebundene Phase (B) wird in 10 ml Riafluor^R (s.S. 9) gezählt. Der auf der Säule verbleibende freie Anteil der Hormone wird mit 25 g/l Polyvinylpyrrolidon in einer Lösung von 50 mmol/l NaOH und 150 mmol/l NaCl eluiert und verworfen.

Für die Eichkurve wurden statt 100 μ l Serum je 100 μ l von Standardlösungen mit steigenden Konzentrationen von 0 bis 16 ng Thyroxin/100 μ l eingesetzt.

Radioimmunologische Analyse

Die Bestimmung wurde mit einem fertigen radioimmunologischen Bestimmungssatz (s.S. 6) durchgeführt.

10 μ l Serum werden mit 100 μ l 125 Jod-Thyroxinlösung (0,02 ng/100 μ l), 100 μ l Barbitalpuffer (pH 8,6), 200 μ l Anilin-Naphthalin-Sulfonsäure und 100 μ l Antikörperverdünnung 1:10 000 (s.S. 6) zweieinhalb Stunden bei +37°C inkubiert. Endogenes und radioaktives Hormon konkurrieren um die Bindung an den Antikörper. Nachdem die Proben eine halbe Stunde im Eisbad gestanden haben, wird der freie Anteil der Hormone mit 500 μ l Kohle-Dextran Suspension digeriert. 500 μ l des Überstandes (gebundene Phase = B) werden in 10 ml Riafluor^R (s.S.10) gezählt.

Für die Eichkurve wurden statt des Serums je 10 μ l Thyroxin-freies Serum eingesetzt und für 100 μ l Barbitalpuffer je 100 μ l von Standardlösungen mit steigenden Konzentrationen von 0 bis 4 ng Thyroxin/100 μ l.

Trijodthyroninbestimmung

Radioimmunologische Analyse

Die Bestimmung erfolgte mit einem fertigen radioimmunologischen Bestimmungssatz (s.S. 6) genau wie für Thyroxin beschrieben. Statt 10 μ l Serum (bzw. Thyroxin-freies Serum) werden 50 μ l eingesetzt. Die Antikörperverdünnung betrug 1:20 000. Die Eichstandards hatten Konzentrationen von 0 bis 2 ng Trijodthyronin/100 μ l.

c) Auswertung

Die Zählung der 3 H- und 125 J-markierten Proben erfolgte in einem β -Flüssigkeits-Szintillationszähler (BF - Vertriebs-GmbH, Bensberg).

Für die 3 H-markierten Proben wurde ein Toluolfluor unter Zusatz von 1/5 (radioimmunologische Analyse) oder 1/3 (competitive Proteinbindungsanalyse) Triton X-100 einge-

setzt. Dieser ergab in unserem Zähler eine Zählausbeute von ca. 40%. Für die ^{125}J -markierten Proben wurde der fertige Riafluor^R verwendet. Er ergab eine Zählausbeute von ca. 80%.

Die Zählzeit der Proben betrug zwischen 10 und 20 Minuten je nach Aktivität der einzelnen Proben. Damit wurde bei fast allen Proben eine Zählrate von 10 000 counts (und damit ein statistischer Fehler von <2%) in einer angemessenen Zeit erreicht.

Die Meßergebnisse wurden nach der Spline-Annäherung ausgewertet. Die Werte der einzelnen Meßproben (B s.o.) werden in Prozent des Nullwertes (B_0) angegeben: $B / B_0\%$. Nullwerte sind Proben, die kein Serum bzw. Standard enthalten, sondern nur radioaktives Hormon und Antikörper.

Für die Eichkurve wurden die $B/B_0\%$ -Werte der Eichproben (y-Achse) gegen ihre Konzentrationen (x-Achse) auf ein Logit-Papier aufgetragen. Diese Log-Logit Transformation:

$$\text{logit} (B/B_0) = \ln \left[(B/B_0) / (1-B/B_0) \right]$$

linearisiert einen sigmoidalen Kurvenverlauf annähernd (Zettner, 1973; Rodbard, 1974).

Die Werte der einzelnen Versuchsgruppen wurden gemittelt. Die Mittelwerte werden stets mit ihrem Fehler angegeben ($m \pm se$).

Die Unterschiede zwischen Mittelwerten wurden mit der Student-T-Verteilung auf ihre Signifikanz überprüft.

d) Liste der Abkürzungen

T_4 = Thyroxin

T_3 = Trijodthyronin

BEI = butanol-extractable iodine, butanolextrahierbares Jod

PBI = protein-bound iodine, proteingebundenes Jod

CPBA = competitive Proteinbindungsanalyse

RIA = radioimmunologische Analyse

TBG = Thyroxin-bindendes Globulin

TBA = Thyroxin-bindendes Albumin

TBPA = Thyroxin-bindendes Praealbumin

TSH = thyroid-stimulating hormone, Thyrotropin

C. E R G E B N I S S E

I. Hormonbestimmungen

a) Glucocorticoide

Competitive Proteinbindungsanalyse

Die competitive Proteinbindungsanalyse beruht auf der Verdrängung des zu bestimmenden Hormons aus seiner Eiweißbindung durch einen Tracer (radioaktiv-markiertes Hormon), der die gleiche Affinität zum Trägerprotein hat:

Zu einer unbekannten aus dem Serum extrahierten Menge Hormon wird eine definierte Menge radioaktiv markiertes Hormon gegeben, welches an ein Trägerprotein gebunden ist. Da sich radioaktives und unmarkiertes Hormon chemisch identisch verhalten, konkurrieren sie gleichermaßen um die Bindungsstellen des Trägerproteins. Je höher der Anteil des nicht markierten Hormons ist, desto mehr radioaktives Hormon wird vom Trägerprotein verdrängt. Die freigesetzte Menge des Tracers ist dabei proportional der zugefügten Menge inaktiven Hormons.

Da die Meßergebnisse stark von den in vitro Bedingungen abhängen (pH, Ionenstärke, Temperatur, Proteingehalt des bindenden Serums), müssen alle Variablen möglichst konstant gehalten werden, um die Werte verschiedener Meßserien miteinander vergleichen zu können. Temperatur und Durchflußgeschwindigkeit sind durch die Apparatur festgelegt.

Der pH-Wert wurde ständig kontrolliert, da nur im stark sauren Milieu (pH 1) die Corticoide quantitativ an Gel gebunden werden. Bei annähernd neutralem Medium (pH 8,0) ist hingegen die Affinität der Hormone zum Trägerprotein größer als zum Gel.

Die Empfindlichkeit dieser Methode hängt vor allem von folgenden Parametern ab: der Menge des adsorbierenden Gels, der Konzentration des Tracers und der Transcortinkonzentration des bindenden Serums.

Es wurden zuerst die von Horn und Mitarbeitern (1975) angegebenen Verdünnungen eingesetzt. Die Empfindlichkeit war unter diesen Bedingungen jedoch zu gering, um die im Vergleich zum Menschen sehr niedrige Corticoidkonzentration im Serum von Tupajas zu erfassen. Die untere Nachweisgrenze ($B_0 \pm 3s$) lag bei 1 ng/100 μ l. Ein großer Teil der Werte unserer Versuchstiere war niedriger.

Da bei einer Blutentnahme nicht mehr als 0,5 - 1 ml Serum gewonnen wurde und aus diesem neben den Hormonen verschiedene andere Parameter bestimmt werden mußten, konnten für die Bestimmung der Hormone meist nicht mehr als 50 μ l Serum eingesetzt werden. Ich versuchte daher diese Methode für die Messung geringerer Hormonkonzentrationen einzustellen.

Generell gelten zwei Grundsätze für Gleichgewichtsanalysen dieser Art: Erstens sollen im Nullwert der Eichkurve etwa 50% der gesamten vorgelegten Radioaktivität (T) gebunden werden (B_0/T ca. 50% : Zettner, 1973). Zweitens sollte die Konzentration des Tracers den niedrigsten Eichwert nicht überschreiten, da sonst keine quantitative Verdrängung stattfindet.

Im vorliegenden Fall war der unterste Eichwert 0,5 ng/100 μ l und die Menge des Tracers 0.55 ng/ Probe.

Schrittweise wurde die Konzentration des radioaktiven Hormons bis auf 0,25 ng/100 μ l herabgesetzt; das Säulenvolumen wurde auf 4 ml verkleinert und das transcortinreiche Serum so verdünnt, daß immer ein B_0/T von ca. 50% eingehalten wurde.

Hierdurch wurde zwar eine gute Steilheit der Eichkurve bis zu 0,5 ng/100 μ l erreicht; die Schwankungen der Doppelwerte waren aber gerade im unteren Bereich der Eichkurve so groß, daß bei Werten von weniger als 1 ng/100 μ l keine sinnvollen Aussagen mehr möglich waren. Der mit dieser Methode gemessene Basalwert männlicher Tupajas lag bei $4,1 \pm 0,3$ μ g in 100 ml Serum ($n = 14$).

Da die peripheren Steroide bei allen bisher untersuchten Säugetieren identisch sind (Raith 1975; Nieschlag und Wickings, 1975), wurde eine für den humanen Bereich entwickelte radioimmunologische Analyse eingesetzt.

Radioimmunologische Analyse

Das Reaktionsprinzip ist das gleiche wie bei der kompetitiven Proteinbindungsanalyse, nur wird das Trägerprotein durch einen Antikörper ersetzt, der das zu bestimmende Hormon spezifisch bindet. Der verwendete Antikörper (s.S.5) reagiert mit den Glucocorticoiden gleichermaßen; dies war notwendig, da Tupajas nach unseren bisherigen Befunden Cortisol und Corticosteron in wechselnden Anteilen im Blut haben.

Die Affinität des Antikörpers für die Glucocorticoide übersteigt die Bindungsaffinität des Transcortins um ein Vielfaches (Nieschlag und Wickings, 1975). Daher kann man durch Bindung mit einem Antikörper eine viel höhere Empfindlichkeit erreichen als durch Proteinbindung.

Die Inkubation (und damit die eigentliche Hormonbestimmung) wird bei der verwendeten Methode mit 5 μ l Serum (d.h. mit 1/10 der ursprünglich extrahierten Serummenge) ausgeführt. Um auch sehr niedrige Hormonkonzentrationen im Blut der Tupajas erfassen zu können, sollte eine Nachweisgrenze von 0,05 ng/100 μ l erreicht werden. Deshalb wurde der Tracer auf 0,02 ng Cortisol/100 μ l verdünnt. Für die radioimmunologische Methode gilt ebenfalls, daß eine Bindung von ca. 50% des Tracers im Nullwert der Eichkurve Voraussetzung für eine sehr hohe Empfindlichkeit ist; dies war bei einer Verdünnung des Antikörpers von 1:10 000 der Fall.

Auch bei dieser Analyse beeinflussen verschiedene Variablen die Ergebnisse. Deshalb wurden folgende Bedingungen eingehalten:

Zur Extraktion wurde ausschließlich speziell gereinigtes Dichlormethan (für die Fluoreszenzspektroskopie) verwendet,

da Verunreinigungen zu überhöhten Werten führen. Der pH-Wert und die Temperatur waren von Meßreihe zu Meßreihe konstant. Die Einwirkungszeit der Dextranaktivkohle wurde exakt eingehalten, da die Kohle, die die freien Hormone bindet, eine Dissoziation des Antikörpers bewirkt (Nieschlag und Wickings, 1975).

Statt des zweifach markierten Cortisols wurde ein vierfach markiertes eingesetzt (s.S. 5), um bei der Zählung der Radioaktivität einen möglichst kleinen statistischen Fehler zu erreichen. Dies ergab für den Nullwert der Eichkurve ca. 2200 cpm (counts/Minute). So wurden für die Proben 10 000 counts bei einer Zählzeit von maximal 20 Minuten erreicht: der statistische Fehler war $\leq 2\%$.

Die Eichkurve (s.Abb.1) wurde nicht extrahiert, da die Wiederfindung nach der Extraktion bei 85 - 95% lag. Die Werte der extrahierten Proben wurden mit dem Faktor B_{01}/B_{on} korrigiert. B_{01} ist der Nullwert der Eichkurve und B_{on} der Nullwert der jeweiligen Extraktionsreihe.

In jeder Extraktionsreihe wurde eine Kontrolle (Standard 2 ng/100 μ l) mitbestimmt.

Der Variationskoeffizient VK betrug:

in der Serie: VK = 9,0% ($2,1 \pm 0,1$ ng/100 μ l; $n = 10$)
von Tag zu Tag: VK = 12,5% ($2,0 \pm 0,1$ ng/100 μ l; $n = 12$)

Die untere Nachweisgrenze betrug 0,05 ng/100 μ l ($B_0 \pm 3s$).

b) Schilddrüsenhormone

Thyroxin

Zur Bestimmung des Thyroxins wurde anfangs ebenfalls die von Horn und Mitarbeitern (1975) modifizierte competitive Proteinbindungsanalyse eingesetzt (s.S.8).

Auch hier war die Empfindlichkeit für unsere Messungen zu gering (Nachweisgrenze 1 ng/100 μ l). Erstens haben unsere Versuchstiere eine wesentlich niedrigere Thyroxinkonzentration im Blut als Menschen; zweitens konnten aus den oben

genannten Gründen meist nicht mehr als 50 μ l Serum eingesetzt werden. Daher wurde versucht eine höhere Empfindlichkeit zu erreichen.

Durchflußgeschwindigkeit und Temperatur sind von der Apparatur festgelegt. Auch der pH-Wert kann nicht geändert werden, da nur im stark alkalischen Milieu (pH 10) eine vollständige Extraktion der Hormone möglich ist, bzw. bereits bei einem pH-Wert von 8,6 die Bindung des Thyroxins an Thyroxin-bindendes Globulin größer ist als ans Gel.

Folgende Parameter wurden geändert: 1.) Das Säulenvolumen wurde auf 1,5 ml verkleinert. 2.) Das bindende Serum und die Transcortinlösung wurden schrittweise weiter verdünnt.

Bei einer Konzentration des Tracers von 0,3 ng/100 μ l und einer Verdünnung des bindenden Serums von 1:50 bis 1:80 (B_0/T immer ca. 50%), wurde eine untere Nachweisgrenze von 0,5 ng/100 μ l erreicht. Ebenso wie bei der Bestimmung der Corticoide waren die Schwankungen der Werte besonders im unteren Bereich der Eichkurve zu hoch, um sinnvolle Aussagen machen zu können. Da auch die Schilddrüsenhormone nicht artspezifisch sind (Refetoff et al., 1970), wurde ein Antiserum ausprobiert, welches für die Bestimmung des Thyroxins im menschlichen Serum verwendet wird.

Der radioimmunologische Bestimmungssatz (s.S. 6) besteht aus einzelnen Lösungen, deren Verdünnungen je nach Bedarf verändert werden können. Das Hormon wird bei dieser Methode nicht extrahiert, sondern durch Anilin-Naphthalin-Sulfonsäure von den Trägereiweißen gespalten. Thyroxin ist im Blut zum größten Teil (ca. 60%) spezifisch an Thyroxin-bindendes Globulin (TBG) gebunden. Etwa 30% liegen an Thyroxin-bindendes Praealbumin (TBPA) und ca. 10% an Thyroxin-bindendes Albumin (TBA) gebunden vor, diese Bindungen sind jedoch unspezifisch. Die Anilin-Naphthalin-Sulfonsäure hat eine höhere Affinität als Thyroxin zum TBG und kann daher das Hormon quantitativ verdrängen.

Die Nachweisgrenze dieser Methode betrug $0,1 \text{ ng}/100 \mu\text{l}$ ($B_0 \pm 3s$), die Genauigkeit war jedoch in diesem Bereich so gering, daß die Analyse ohne Änderungen nicht für die Messung von Tupajaseren verwendet werden konnte.

Der Antikörper wurde von 1:10 000 auf 1:14 000 verdünnt. So wurde das Verhältnis B_0/T von ca. 60% auf ca. 45% erniedrigt und damit eine Nachweisgrenze von $0,05 \text{ ng}/100 \mu\text{l}$ erreicht. Dies war für die vorliegenden Untersuchungen ausreichend.

Durch weitere Verdünnung konnte zwar die Empfindlichkeit noch weiter erhöht werden, die Werte des Kontrollserums lagen jedoch um etwa 50% zu hoch. Dies beruhte wahrscheinlich auf einer Verdrängung von radioaktivem Hormon aus seiner Antikörperbindung durch überschüssige Anilin-Naphthalin-Sulfonsäure (Chopra, 1972; Fang und Refetoff, 1974).

Die Inkubationstemperatur schwankte um $\pm 2^\circ\text{C}$. Da die Bindung Thyroxin-Antikörper praktisch temperaturunabhängig ist (Keane et al., 1976), hatte dies keinen wesentlichen Einfluß auf die Bestimmungen. Die Reaktionszeit mit der Dextranaktivkohle wurde exakt eingehalten.

Zu allen Eichproben wurden $10 \mu\text{l}$ Thyroxin-freies Serum zugesetzt, da ein Einfluß der Serumeiweiße auf die Bindung Antikörper-Hormon nicht auszuschließen ist (Chopra, 1972; Seth et al., 1975).

Der Variationskoeffizient VK für das Kontrollserum ($7,5 \text{ ng}/100 \mu\text{l}$) ergab:

in der Serie: $VK = 8,2\%$ ($8,2 \pm 0,1 \text{ ng}/100 \mu\text{l}$; $n = 27$)
von Tag zu Tag: $VK = 13,8\%$ ($7,8 \pm 0,4 \text{ ng}/100 \mu\text{l}$; $n = 5$)

Die untere Nachweisgrenze betrug $0,05 \text{ ng}/100 \mu\text{l}$ ($B_0 \pm 3s$).

Trijodthyronin

Für die Trijodthyroninbestimmung wurde ebenfalls ein radioimmunologischer Bestimmungssatz verwendet, der auf höhere Empfindlichkeit eingestellt wurde (s.S. 6). Temperatur, pH-Wert und Inkubationszeiten wurden genau konstant gehalten. Der Antikörper wurde von 1:20 000 auf 1:50 000 verdünnt; die Bindung im Nullwert lag dann bei $B_0/T = \text{ca. } 45\%$.

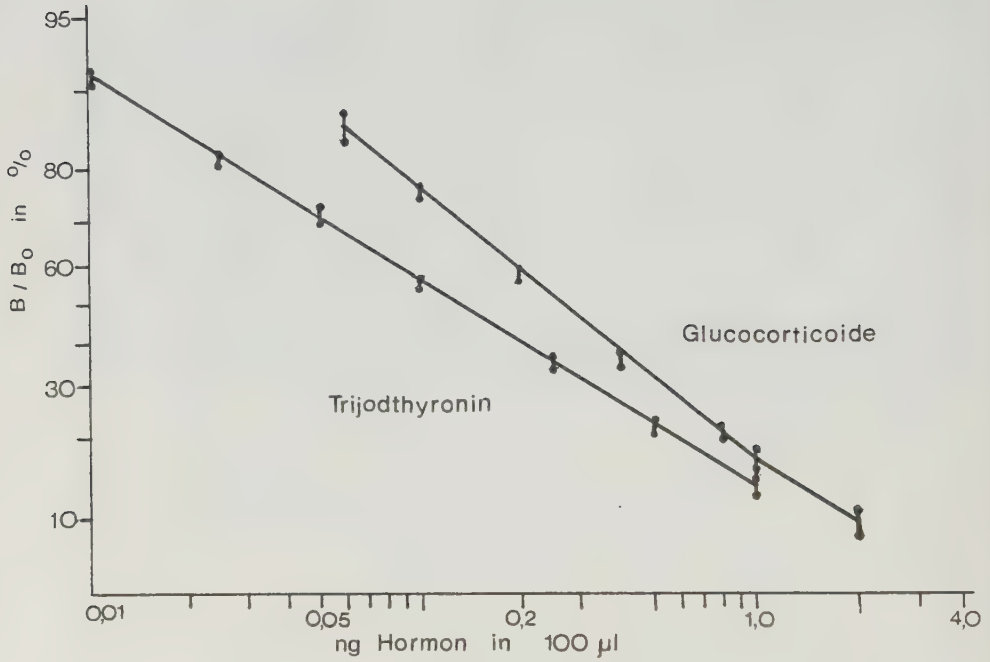


Abb. 1

Eichkurven für die Glucocorticoide und Trijodthyronin. Die Zählraten der Eichproben (B) sind in Prozent des Nullwertes (B_0) gegen die Konzentration der Standardlösungen aufgetragen. Die Werte einer Doppelbestimmung sind durch einen senkrechten Balken miteinander verbunden.

Zur Eichkurve (s. Abb.1) wurden jeweils 50 μ l Trijodthyronin-freies Serum gegeben, um etwa die gleiche Eiweißkonzentration wie in den Serumproben zu erhalten (s.o.).

Der Variationskoeffizient VK für das Kontrollserum (0,17 ng /100 μ l) betrug:

in der Serie: VK = 9,1% (0,21 $\pm$ 0,01 ng/100 μ l; n = 47)

von Tag zu Tag: VK = 8,5% (0,21 $\pm$ 0,01 ng/100 μ l; n = 7)

Die untere Nachweisgrenze war 0,01 ng/100 μ l ($B_0 \pm 3s$).

II. Die Hormonspiegel im Blut und ihre Veränderungen

a) Basalwerte

Kontrolltieren wurde morgens um 9⁰⁰Uhr Blut entnommen. Die Glucocorticoidkonzentrationen des Serums variierten von 0,5 - 3,0 μ g/100 ml (Mittelwert: 1,9 $\pm$ 0,1; n = 72). Die Thyroxinwerte lagen zwischen 1,3 - 3,9 μ g/100 ml (Mittelwert: 2,8 $\pm$ 0,1; n = 88), die Trijodthyroninwerte zwischen 0,05 - 0,19 μ g/100 ml (Mittelwert: 0,11 $\pm$ 0,01; n = 92); (Abb. 2).

Um festzustellen, wie sich die Blutentnahme bei Tupajas auf die Hormonspiegel im Blut auswirkt, wurde sechs Kontrolltieren mehrmals in kurzen Abständen Blut entnommen. Bei Versuchsbeginn (9⁰⁰Uhr) wurden die Tiere aus ihren Käfigen genommen und während des 30-minütigen Versuches ständig in der Hand gehalten.

Während der ersten drei Minuten bleibt die Corticoidkonzentration im Blut der Tiere nahezu unverändert; sie steigt dann sehr stark an und erreicht nach 15 Minuten ihren maximalen Wert (6,4 μ g/100 ml). Nach 30 Minuten ist sie wieder auf 5,5 μ g/100 ml gesunken; dieser Wert liegt noch ca.250% über dem Ausgangswert von 1,6 μ g/100 ml (Abb. 3).

Der Thyroxingehalt des Serums ist bereits nach fünf Minuten niedriger als der Ausgangswert; nach 15 Minuten erreicht er ein Minimum, das mit $p \approx 0,05$ vom Ausgangswert verschied-

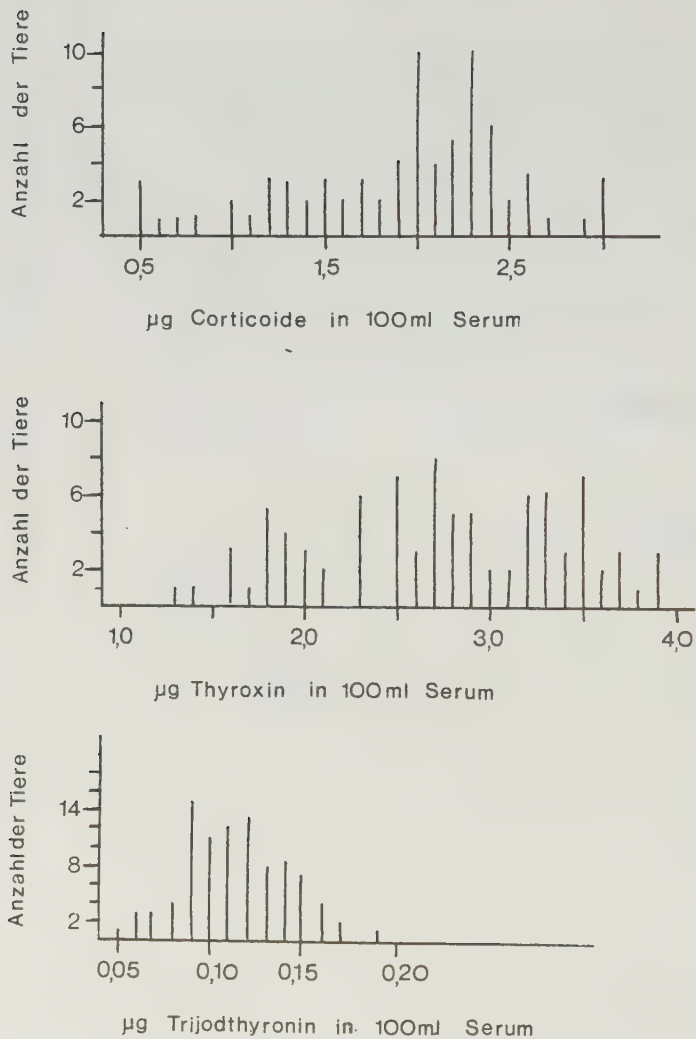


Abb. 2

Verteilung der Basalwerte der Nebennierenrinden- und Schilddrüsenhormone im Blut männlicher Tupajas.

Die Mittelwerte betragen:

Glucocorticoide:	$1,9 \pm 0,1$ µg/100ml Serum (n=72)
Thyroxin:	$2,8 \pm 0,1$ µg/100ml Serum (n=88)
Trijodthyronin:	$0,11 \pm 0,01$ µg/100ml Serum (n=92)

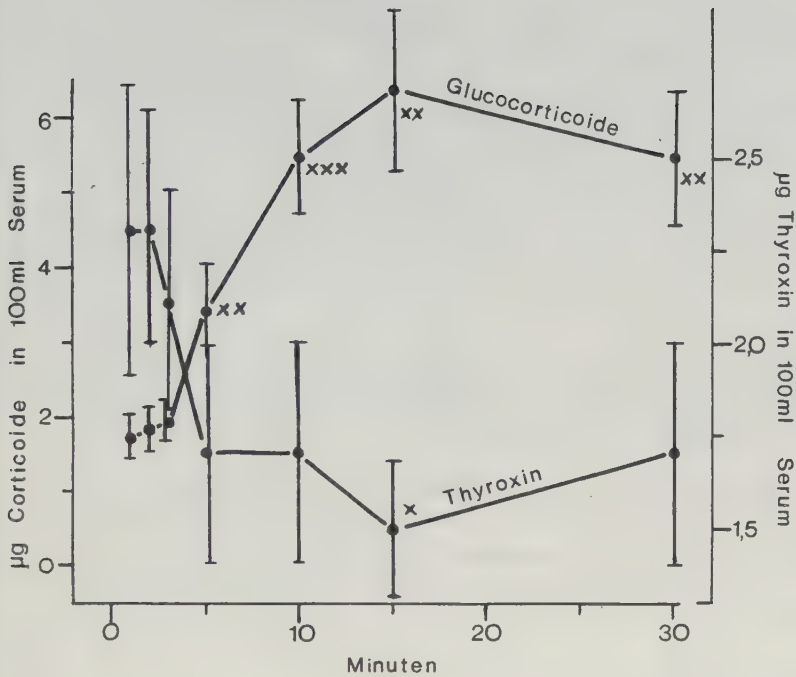


Abb. 3

Änderung der Hormonkonzentrationen im Blut männlicher Tupajas (Mittelwerte mit ihrem Fehler) bei mehrfacher Blutentnahme innerhalb einer halben Stunde. Versuchsbeginn war der Moment in dem der Raum mit den Tieren betreten wurde; die erste Blutentnahme war in weniger als 60 Sekunden nach Betreten des Raumes beendet. Jede weitere Blutentnahme war innerhalb weniger als 30 Sekunden abgeschlossen.

Gegenüber dem Ausgangswert signifikante Unterschiede sind angegeben: $x = p < 0,05$; $xx = p < 0,01$; $xxx = p < 0,001$

den ist. Im weiteren Verlauf steigt der Thyroxingehalt wieder an und ist nach 30 Minuten vom Ausgangswert nicht mehr signifikant verschieden (Abb. 3).

Das Absinken des Thyroxinspiegels kann nicht auf einer veränderten Blutverteilung im Schwanz beruhen, da andere Parameter sich nicht entsprechend verringern: z.B. die Konzentrationen von Eiweiß, Hämoglobin, und Harnstoff-N im Blut (v.Holst, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Konzentrationen der Glucocorticoide und des Blutzuckers steigen erwartungsgemäß an.

Trijodthyronin konnte nur in wenigen Fällen bestimmt werden, da in diesem Versuch nicht immer genügend Blut entnommen werden konnte. Die wenigen Daten lassen jedoch vermuten, daß der Trijodthyronin- ebenso wie der Thyroxingehalt anfänglich absinkt und dann wieder ansteigt.

Diese Ergebnisse zeigen: Blutentnahmen müssen spätestens drei Minuten nach Betreten des Versuchsraumes abgeschlossen sein. Daher wurden in den folgenden Untersuchungen alle Blutproben verworfen, die nicht innerhalb dieser Zeit gewonnen wurden.

b) Tagesperiodische Schwankungen

Je einer Gruppe Tupajas wurde zu verschiedenen Uhrzeiten Blut entnommen; die Werte einer jeden Gruppe wurden gemittelt (Tab. 1; Abb. 4).

Die Konzentration der Glucocorticoide zeigt eine deutliche tagesperiodische Veränderung mit einem Maximum kurz vor Beginn der Aktivitätsphase; dieser Wert liegt um 90% über dem niedrigsten Wert um 0⁰⁰Uhr ($p < 0,001$).

Der Thyroxingehalt im Blut läßt keine tagesperiodische Schwankung erkennen.

Der Trijodthyroningehalt des Blutes zeigt ebenfalls einen tagesperiodischen Verlauf. Das Maximum um 18⁰⁰Uhr liegt um mehr als 50% über den Werten zwischen 21 und 6⁰⁰Uhr ($p < 0,05$), mit Ausnahme des 24⁰⁰Uhr Wertes.

Glucocorticoide µg/100 ml				Thyroxin µg/100 ml				Trijodthyronin µg/100 ml			
Zeit	n	m ± se	Streuung	n	m ± se	Streuung	n	m ± se	n	m ± se	Streuung
0 ⁰⁰	5	1,0 ± 0,1	0,5 - 1,3	5	2,4 ± 0,1	2,0 - 2,8	5	0,10 ± 0,02	5	0,10 ± 0,02	0,07 - 0,15
3 ⁰⁰	4	1,2 ± 0,2	0,8 - 1,6	4	2,6 ± 0,6	1,6 - 4,1	5	0,08 ± 0,02	5	0,08 ± 0,02	0,04 - 0,15
6 ⁰⁰	5	1,2 ± 0,1	0,9 - 1,4	7	2,4 ± 0,1	1,9 - 2,7	8	0,09 ± 0,01	8	0,09 ± 0,01	0,02 - 0,13
9 ⁰⁰	72	1,9 ± 0,1	0,5 - 2,7	49	2,9 ± 0,0	2,4 - 3,4	92	0,11 ± 0,00	92	0,11 ± 0,00	0,05 - 0,19
12 ⁰⁰	6	1,6 ± 0,2	1,0 - 2,6	6	1,6 ± 0,3	0,7 - 2,5	6	0,11 ± 0,02	6	0,11 ± 0,02	0,03 - 0,15
15 ⁰⁰	6	1,4 ± 0,1	1,2 - 1,9	3	3,2 ± 0,4	2,5 - 3,9	6	0,11 ± 0,02	6	0,11 ± 0,02	0,06 - 0,16
18 ⁰⁰	2	1,2	0,8 + 1,6	5	2,9 ± 0,3	2,1 - 3,8	6	0,14 ± 0,01	6	0,14 ± 0,01	0,12 - 0,19
21 ⁰⁰	7	1,1 ± 0,1	0,8 - 1,5	6	2,6 ± 0,4	1,7 - 2,9	6	0,09 ± 0,02	6	0,09 ± 0,02	0,02 - 0,12

Tabelle 1

Hormonkonzentrationen im Blut männlicher Tupajas zu unterschiedlichen Tageszeiten

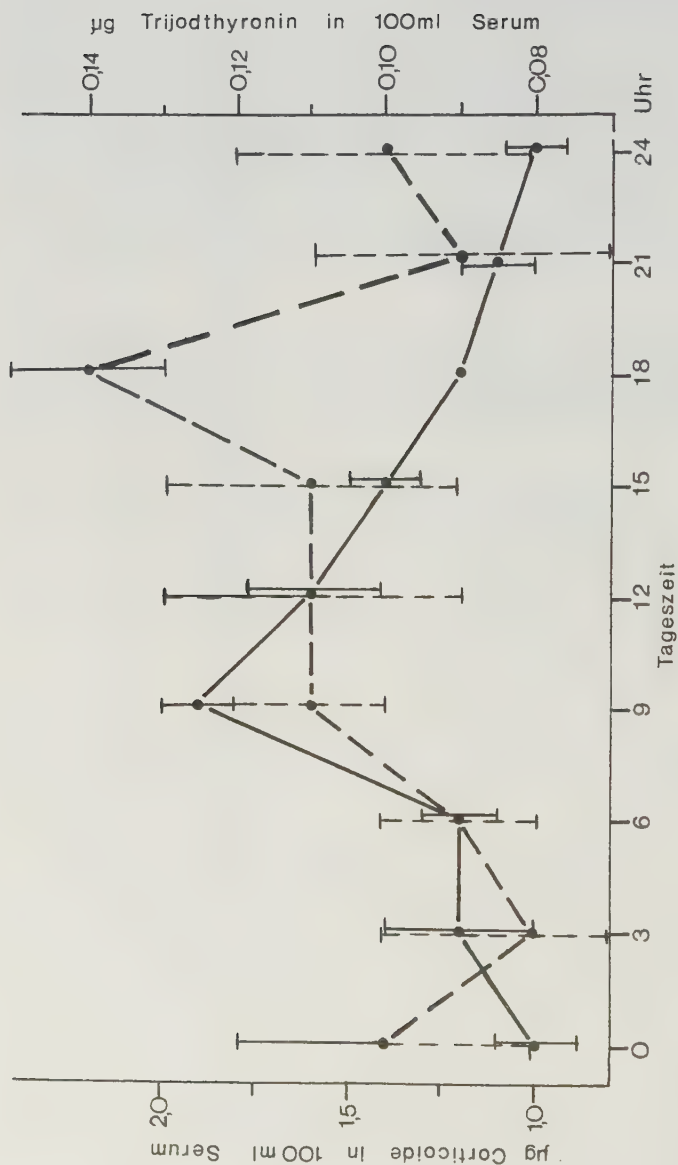


Abb. 4

Konzentrationen der Glucocorticoide (—) und des Trijodthyronins (----) im Blut männlicher Tupajas zu unterschiedlichen Tageszeiten. Es sind jeweils die Mittelwerte einer Gruppe von Versuchstieren mit ihrem Fehler aufgetragen (Tab. 1).

c) Kurzzeitstress

Fünf Gruppen Tupajas wurden folgenden einstündigen Belastungen ausgesetzt: Blutentnahme, Umsetzen, Kälte, Schwimmen und Kampf. Den Tieren wurde direkt vor Versuchsbeginn und eine Stunde später Blut entnommen (Tab. 2).

Blutentnahme

Den Versuchstieren wurde im Abstand von einer Stunde zweimal Blut entnommen; in der Zeit zwischen den beiden Blutentnahmen werden sie in ihre eigenen Käfige zurückgesetzt.

Während sich die Glucocorticoidwerte vor und nach dem Versuch nicht unterscheiden, nimmt die Serumkonzentration von Thyroxin und Trijodthyronin deutlich ab ($p < 0,05$).

Umsetzen

Die Versuchstiere wurden in der Zeit zwischen erster und zweiter Blutentnahme in einen leeren Käfig eines fremden Artgenossen gesetzt. Dies hat einen Anstieg des Glucocorticoidgehaltes des Serums um ca. 200% ($p < 0,001$) und eine Abnahme der Thyroxinkonzentration zur Folge; allerdings ist diese nicht signifikant. Die Trijodthyroninwerte bleiben im Mittel unverändert.

Nachdem die Trijodthyroninkonzentration im Serum bei reiner Blutentnahme signifikant absinkt (s.o.), weist das Gleichbleiben der Werte beim Umsetzen auf einen Anstieg der Hormonkonzentration hin: Vergleicht man die prozentuale Veränderung (Tab. 2, Spalte: Änderungen in % der A-Werte) beim Umsetzen und der Blutentnahme miteinander, so ist die Trijodthyroninkonzentration im Blut gegenüber der reinen Blutentnahme erhöht ($p < 0,05$).

Kälte

Die Versuchstiere wurden in ihren Schlafkästen für eine Stunde in eine Kühlkammer gestellt. Die Temperatur in den

Schlafkästen betrug +7 bis +8°C; die Rektaltemperatur der Tiere war jedoch nicht erniedrigt.

Der Corticoidgehalt des Serums nimmt im Mittel leicht zu ($p \approx 0,05$), die Reaktionen sind jedoch interindividuell sehr unterschiedlich. Der Thyroxingehalt des Serums nimmt ab ($p < 0,05$), der Trijodthyroninspiegel ändert sich im Mittel nicht signifikant.

Schwimmen

Die Versuchstiere wurden in ein Wasserbassin (Wassertemperatur ca. +37°C) gesetzt und mußten ununterbrochen schwimmen (ca. 45 Minuten). War ein Tier so erschöpft, daß es unterging, wurde es aus dem Becken genommen und nach einer kurzen Erholungspause (weniger als fünf Minuten) wieder ins Wasser zurückgesetzt.

Die Corticoidkonzentration im Blut steigt um etwa 500% ($p < 0,001$); der Trijodthyroningehalt nimmt um ca. 30% ab ($p < 0,05$); der Thyroxinspiegel sinkt, allerdings nicht signifikant.

Bezogen auf die Erniedrigung durch die Blutentnahme allein, ist die Thyroxinkonzentration leicht erhöht ($p < 0,05$).

Kampf (akuter sozialer Stress)

Die Versuchstiere wurden nach der ersten Blutentnahme jeweils einzeln zu einem kampfgeprobten Tier in den Käfig gesetzt, von diesem sofort angegriffen und im allgemeinen in weniger als drei Minuten besiegt. Anschließend wurden beide Tiere durch ein Drahtgitter voneinander getrennt, so daß der Verlierer den Sieger noch sehen aber von ihm nicht mehr angegriffen werden konnte. Dies bedeutet für das unterlegene Tier eine ständige Belastung (Einzelheiten: v.Holst, 1972).

Die Glucocorticoidkonzentration des Serums steigt um ca. 250% an ($p < 0,05$); die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone ändern sich nicht signifikant.

Hormone	Art	A - Wert	B - Wert	Änderung in % der A-Werte	Signifikanz
	der Belastung	n	m $\pm$ se	m $\pm$ se	p
Glucocorticoide	Blutentnahme	12	1,4 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,2	-4 $\pm$ 1 -70 - +85 n.s.
	Umsetzen	8	1,6 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,6	+198 $\pm$ 71 +24 - +600 p<0,001
	Kälte	10	1,7 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,4	+56 $\pm$ 20 -12 - +161 p $\approx$ 0,05
	Schwimmen	7	1,7 $\pm$ 0,1	9,3 $\pm$ 1,0	+478 $\pm$ 95 +285 - +914 p<0,001
	Kampf	8	1,9 $\pm$ 0,3	7,0 $\pm$ 2,2	+249 $\pm$ 80 +60 - +671 p<0,05
Thyroxin	Blutentnahme	14	2,5 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,2	-37 $\pm$ 6 -70 - -11 p<0,01
	Umsetzen	9	2,5 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,2	-29 $\pm$ 4 -58 - -12 n.s.
	Kälte	13	2,2 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,2	-20 $\pm$ 8 -79 - +47 p<0,05
	Schwimmen	7	2,4 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,2	-19 $\pm$ 6 -37 - +4 n.s.
	Kampf	7	2,9 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,3	-24 $\pm$ 9 -45 - +13 n.s.
Trijodthyronin	Blutentnahme	14	0,12 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	-22 $\pm$ 9 -85 - +25 p<0,05
	Umsetzen	12	0,12 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	+26 $\pm$ 21 -36 - +250 n.s.
	Kälte	12	0,13 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	-9 $\pm$ 10 -58 - +60 n.s.
	Schwimmen	8	0,15 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	-33 $\pm$ 6 -53 - -5 p<0,05
	Kampf	6	0,09 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,03	+10 $\pm$ 25 -56 - +111 n.s.

Tabelle 2 Die Auswirkung von verschiedenen kurzzeitigen Belastungen auf die Hormonkonzentrationen im Blut männlicher Tupajas. Das Blut zur Bestimmung der Hormone wurde den Tieren direkt vor Versuchsbeginn um 10.00 Uhr (A-Wert) und eine Stunde später entnommen (B-Wert).

Bezogen auf die Erniedrigung durch die Blutentnahme allein scheint der Trijodthyroningehalt des Blutes anzusteigen. Allerdings ist die Reaktion der einzelnen Tiere derart unterschiedlich, daß der Anstieg nicht zu sichern ist.

d) Sozialer Dauerstress

Tupajas wurden nach der Blutentnahme zu einem kampfproben Tier in den Käfig gesetzt und von diesem in wenigen Minuten unterworfen. Anschließend wurden die Verlierer dem ständigen Anblick des Siegers ausgesetzt (s.o.). Der Kampf mit Unterwerfung wurde in Abständen von 1-2 Tagen wiederholt. Alle 1-3 Tage nach der ersten Unterwerfung wurde den Tieren um 9⁰⁰Uhr Blut entnommen (eine Stunde vor Beginn der Aktivitätsphase).

Versuche ohne Belastung zeigten, daß die Glucocorticoid- und Schilddrüsenhormonwerte über 8 - 10 Tage konstant bleiben, selbst wenn den Tieren täglich Blut entnommen wird.

Oft erhielt man wegen der erhöhten Gerinnung des Blutes und des erniedrigten Blutdruckes nicht ausreichend Blut um alle Bestimmungen durchzuführen: das gilt besonders für die Tiere, die länger als acht Tage unter sozialem Dauerstress lebten. Daher wurden in den Tabellen und Abbildungen nur Werte bis zum vierten bzw. sechsten Tag aufgeführt.

Die unterlegenen Tiere starben innerhalb von 2 bis 26 Tagen nach extremen Veränderungen nahezu aller physiologischer Parameter.

Nach ihrer Reaktion lassen sich deutlich zwei Gruppen unterscheiden: Tiere, die innerhalb von weniger als sechs Tagen sterben (Gruppe A) und Tiere, die 8 - 16 Tage leben (Gruppe B).

Typisch für die Tiere der Gruppe A ist der starke Anstieg des Harnstoff-N im Blut, der auf einer mehr oder weniger starken Drosselung der Nierendurchblutung beruht. Die meisten dieser Tiere sterben eindeutig an einer Urämie (Einzelheiten: v.Holst, 1972).

Auch bei den länger lebenden Tieren der Gruppe B steigt der Harnstoff-N im Blut an, doch erreicht er keine urämischen Werte. Die Todesursache dieser Tiere ist bisher nicht geklärt.

Ein Vergleich der Ausgangswerte aller Tiere (sowohl Gruppe A als auch B) mit denen des letzten Lebenstages zeigt: Die Serumkonzentration der Glucocorticoide steigt unabhängig vom Zeitpunkt des Todes an: von $2,1 \pm 0,2$ auf $14,6 \pm 2,5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($n = 11$; $p < 0,001$). Entsprechend nimmt das Gewicht der die Glucocorticoide synthetisierenden und abgebenden Nebennieren innerhalb von 4 - 6 Tagen um mehr als 80% zu. Es steigt von $18,7 \pm 0,5 \text{ mg}$ ($n = 20$) auf $34,8 \pm 2,7 \text{ mg}$ ($n = 22$) und bleibt dann im Verlauf der weiteren Belastung konstant (v. Holst, unveröffentlichte Ergebnisse).

Der Serumspiegel der Schilddrüsenhormone ist am letzten Lebenstag beträchtlich erniedrigt:

Thyroxin von $2,9 \pm 0,3$ auf $0,7 \pm 0,2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($n = 11$; $p < 0,001$);

Trijodthyronin von $0,12 \pm 0,01$ auf $0,06 \pm 0,02 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($n = 10$; $p < 0,05$).

Der Verlauf der Änderungen der Hormonkonzentrationen ist von Tier zu Tier sehr unterschiedlich. Trotzdem lassen sich die beiden Gruppen A und B ebenfalls unterscheiden (Abb. 5 und 6; Tab. 3a und 3b). Bei den Tieren der Gruppe A steigt der Gehalt der Glucocorticoide im Blut nach der ersten Unterwerfung von Tag zu Tag gleichmäßig bis zum Tod an. Ebenso gleichmäßig nehmen die Konzentrationen von Thyroxin und Trijodthyronin im Verlauf des Versuches ab.

Bei den Tieren der Gruppe B bleibt der Serumspiegel der Glucocorticoide hingegen innerhalb der ersten Tage weitgehend konstant. Ein Anstieg erfolgt nach unseren bisherigen Befunden je nach Individuum erst nach sechs bis acht Tagen. Auch die Konzentration des Trijodthyronins bleibt innerhalb der ersten Tage durchweg konstant. Der

Thyroxingehalt des Serums ist bereits nach einem Tag auf ca. 50% abgesunken ($p < 0,05$), bleibt dann aber im Mittel konstant auf diesem Wert.

Hormone					Werte in % der Ausgangswerte $\bar{m} \pm se$
	Tag	n	$\mu g/100 ml$ $m \pm se$	Streuung	
Glucocorticoide	0	6	$2,1 \pm 0,2$	$1,4 - 2,9$	100
	1	5	$3,5 \pm 0,7$	$1,6 - 5,5$	167 ± 23
	2	2	11,0	$8,4 + 13,5$	618
	3	4	$22,5 \pm 2,0$	$16,5 - 25,2$	1087 ± 166
	4	2	22,3	$16,9 + 27,7$	1327
Thyroxin	0	6	$2,8 \pm 0,4$	$1,7 - 4,7$	100
	1	5	$1,1 \pm 0,3$	$<0,1 - 2,1$	42 ± 14
	2	3	$0,9 \pm 0,5$	$<0,1 - 1,9$	27 ± 30
	3	5	$0,4 \pm 0,2$	$<0,1 - 0,9$	14 ± 8
	4	2	0,9	$0,1 + 0,8$	11
Trijodthyronin	0	5	$0,11 \pm 0,02$	$0,07 - 0,16$	100
	1	5	$0,07 \pm 0,02$	$0,02 - 0,11$	65 ± 22
	2	3	$0,06 \pm 0,02$	$0,02 - 0,08$	63 ± 17
	3	4	$0,05 \pm 0,02$	$<0,01 - 0,10$	45 ± 33

Tabelle 3a
Gruppe A

Hormonkonzentrationen im Blut männlicher Tupajas innerhalb der ersten vier Tage unter sozialem Dauerstress. Versuchsbeginn war am Tag 0.

) Die prozentuale Änderung wurde für jedes einzelne Tier berechnet und die Werte jeder Gruppe gemittelt.

Hormone					Werte in % der ⁽¹⁾ Ausgangswerte
	Tag	n	$\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ $m \pm se$	Streuung	$m \pm se$
Glucocorticoide	0	6	$1,5 \pm 0,2$	$0,6 - 2,1$	100
	1	2	1,6	$0,4 + 2,7$	98
	2	5	$2,4 \pm 0,3$	$1,3 - 2,8$	208 ± 95
	3	2	3,8	$1,3 + 6,2$	186
	4	3	$2,0 \pm 0,8$	$0,6 - 3,2$	130 ± 44
	5	2	1,4	$0,8 + 1,9$	69
Thyroxin	6	5	$5,3 \pm 2,0$	$1,0 - 10,3$	338 ± 104
	0	6	$2,6 \pm 0,3$	$1,5 - 3,2$	100
	1	2	1,2	$0,5 + 1,8$	41
	2	5	$1,2 \pm 0,4$	$0,2 - 2,6$	43 ± 24
	3	2	0,8	$0,5 + 1,1$	31
	4	3	$1,7 \pm 0,4$	$0,9 - 2,2$	57 ± 20
Trijodthyronin	5	2	1,2	$1,0 + 1,3$	42
	6	5	$1,4 \pm 0,6$	$0,6 - 3,1$	50 ± 19
	0	6	$0,09 \pm 0,01$	$0,07 - 0,13$	100
	1	2	0,12	$0,11 + 0,13$	127
	2	5	$0,07 \pm 0,02$	$0,02 - 0,12$	75 ± 18
	3	2	0,13	$0,06 + 0,19$	132
	4	3	$0,09 \pm 0,05$	$0,03 - 0,18$	92 ± 45
	5	2	0,09	$0,07 + 0,11$	99
	6	5	$0,07 \pm 0,02$	$0,01 - 0,15$	82 ± 23

Tabelle 3b

Gruppe B

Hormonkonzentrationen im Blut männlicher Tupajas innerhalb der ersten sechs Tage unter sozialem Dauerstress. Versuchsbeginn war am Tag 0.

(1) Die prozentuale Änderung wurde für jedes einzelne Tier berechnet und die Werte jeder Gruppe gemittelt.

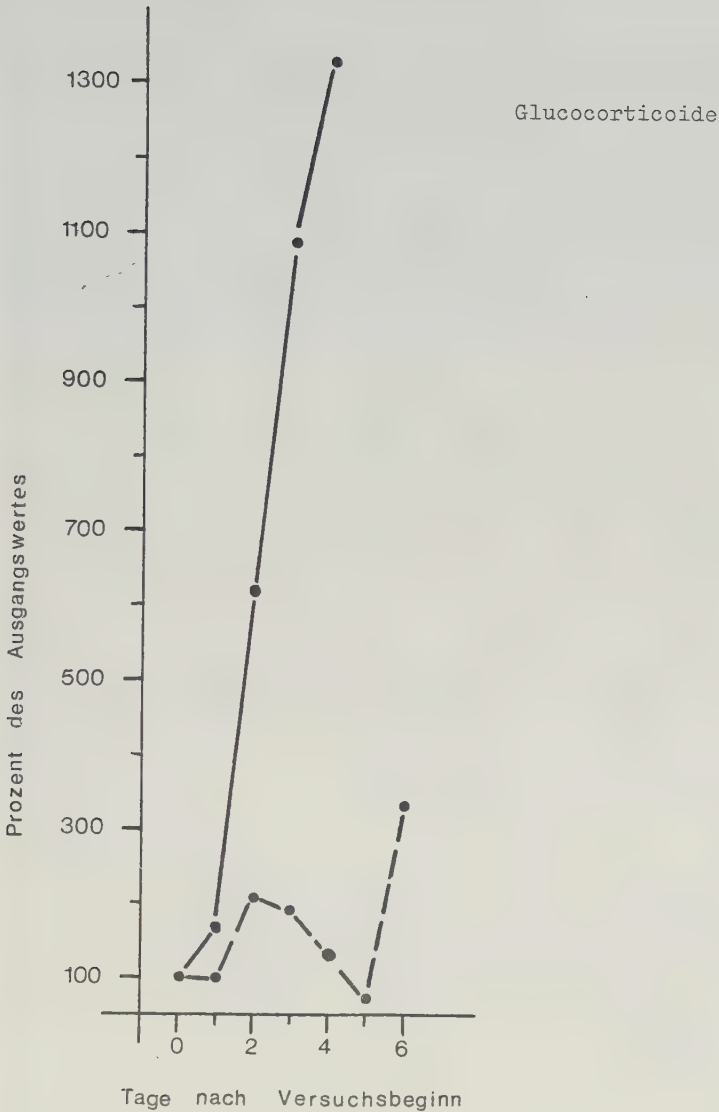


Abb. 5

Hormonkonzentrationen im Blut männlicher Tupajas innerhalb der ersten Tage unter sozialem Dauerstress. Versuchsbeginn war am Tag 0. Es sind jeweils die Mittelwerte einer Gruppe von Versuchstieren aufgetragen (Tab. 3a und 3b). Gruppe A — Gruppe B ----

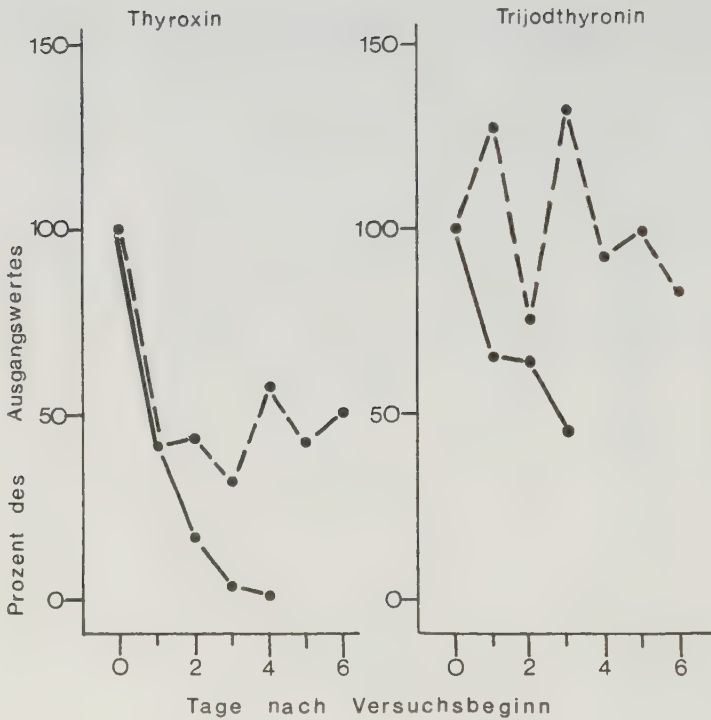


Abb. 6

Hormonkonzentrationen im Blut männlicher Tupajas innerhalb der ersten Tage unter sozialem Dauerstress. Versuchsbeginn war am Tag 0. Es sind jeweils die Mittelwerte einer Gruppe von Versuchstieren aufgetragen (Tab. 3a und 3b).

Gruppe A — Gruppe B ----

D. DISKUSSION

I. Bewertung der Hormonbestimmungen

Die competitive Proteinbindungsanalyse ist in der humanen Hormonanalytik weit verbreitet. Häufig wird sie auch zur Bestimmung von Hormonen in tierischen Seren verwendet. Setzt man dabei artfremde bindende Seren ein, wie in unserem Fall menschliches Serum, so treten eine Reihe von Problemen auf:

Beim Menschen werden die beiden Schilddrüsenhormone fast ausschließlich von drei Serumproteinen gebunden: Thyroxin-bindendes Globulin, - Praealbumin und - Albumin. Über Art und Zusammensetzung der bindenden Proteine ist bei anderen Säugetieren wenig bekannt. (Farer et al., 1962; Tanabe et al., 1969; Refetoff et al., 1970). Nach diesen Befunden scheinen die den menschlichen Trägerproteinen entsprechenden Serum-eiweiße bei Säugetieren allgemein vorhanden zu sein. Die Konzentration der einzelnen Trägerproteine - und damit die Bindungsverhältnisse - sind jedoch von Art zu Art sehr unterschiedlich.

Diese Bindungsverhältnisse beeinflussen jedoch die Ergebnisse der competitiven Proteinbindungsanalyse sehr stark. Setzt man nun wie in unserem Fall menschliches Serum zur Bindung ein, kann man nicht davon ausgehen, daß die für Tupajas gefundenen Werte mit denen des Menschen vergleichbar sind.

Gleichgewichtsanalysen sind von den Bedingungen in vitro abhängig. Daher erhält man - unabhängig von den oben genannten Schwierigkeiten - weder bei der competitiven Proteinbindungs- noch bei der radioimmunologischen Analyse die absoluten Hormonkonzentrationen des Blutes. Jedoch entsprechen die mit der radioimmunologischen Analyse gefundenen Werte eher den absoluten. Dies hat zwei Gründe:

Der Antikörper bindet die Hormone sehr spezifisch. Da die Nebennierenrinden- und Schilddrüsenhormone bei allen Säugtieren identisch sind (s.o.), kann man die Ergebnisse einer radioimmunologischen Analyse unabhängig von der Herkunft des Antikörpers miteinander vergleichen.

Entsprechend liegen für die Glucocorticoide die mit der competitiven Proteinbindungsanalyse gewonnenen Werte um 50 - 100% höher als die Werte der radioimmunologischen Analyse (s. S. 13 und 20). Dies entspricht den Befunden von Farmer und Pierce (1974); die Werte sind jedoch miteinander korreliert (Korrelationskoeffizient $r = 0,74$).

Für Thyroxin erhält man hingegen kaum höhere Werte bei der competitiven Proteinbindungsanalyse als bei der radioimmunologischen Methode (Chopra, 1972; Seth et al., 1975). Die Korrelation ist hier ebenfalls sehr gut (Korrelationskoeffizient $r = 0,93$).

Diese bessere Übereinstimmung der mit den beiden Methoden gewonnenen Werte beruht darauf, daß bei der Bestimmung des Thyroxins mit der competitiven Proteinbindungsanalyse nur das in sehr geringer Konzentration vorliegende Trijodthyronin mitreagiert. Bei der Bestimmung der Glucocorticoide hingegen werden andere Steroidhormone miterfaßt und erhöhen dadurch die Werte (Müller et al., 1974).

Man erhält zwar mit den beiden Methoden keine absoluten Hormonkonzentrationen des Serums, jedoch sind die Werte innerhalb einer Tierart miteinander vergleichbar: Diese Methoden ermöglichen es uns, quantitative Aussagen über die Konzentrationen der verschiedenen Hormone im Blut zu machen.

Die Kenntnis über die Konzentration bestimmter Hormone im Blut allein läßt jedoch keinerlei Aussagen über deren Wirkung auf den Stoffwechsel zu. Dafür gibt es mehrere Gründe:

Mehr als 90% der Nebennierenrinden- und Schilddrüsenhormone sind unter Normalbedingungen an die Trägereiweiße gebunden. Stoffwechselwirksam ist jedoch nur der freie, sehr geringe Anteil der Hormone (Übersicht: Pfannenstiel, 1974; Raith, 1975). Dieser freie Anteil ist jedoch keineswegs konstant. Er kann sich bei verschiedenen Stoffwechselerkrankungen (z.B. Hypo- und Hyperthyreose) ändern, ebenso wie unter akuter Belastung (Bronson und Eleftheriou, 1965; Balsam und Leppo, 1974). Diese Änderung des stoffwechselaktiven Anteils muß hierbei nicht mit einer entsprechenden Veränderung der Gesamtkonzentrationen einhergehen. Andererseits beinhaltet eine Änderung der Gesamtkonzentration der Hormone nicht unbedingt eine Änderung des freien Anteils. So findet man bei Schwangeren einen erhöhten Spiegel des gesamten Thyroxins und Trijodthyronins, während der freie Anteil beider Hormone den normalen Werten entspricht (Pfannenstiel, 1974; Raith, 1975); umgekehrt ist die Konzentration der Hormone bei angeborenem Mangel an Thyroxin-bindendem Globulin erniedrigt, der freie Anteil der Hormone ist ebenfalls normal (Pfannenstiel, 1974; Woeber und Ingbar, 1974).

Deshalb ist eine Voraussage über den Spiegel der freien Hormone selbst bei der extremen Abnahme der Thyroxinwerte (und Trijodthyroninwerte) der Tupajas unter sozialem Dauerstress nicht möglich. Der freie Anteil der Hormone im Blut könnte sogar erhöht sein, zumal der Albumingehalt im Blut dieser Tiere innerhalb von vier Tagen auf weniger als 50% abnimmt (v.Holst, unveröffentlichte Ergebnisse).

II. Bewertung der Hormonspiegel und ihrer Veränderungen

Der Basalwert der Glucocorticoide männlicher Tupajas beträgt unter unseren standardisierten Haltungsbedingungen $1,9 \pm 0,1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$. Dieser Wert liegt beträchtlich unter dem des Menschen ($8 - 18 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$: Raith, 1975). Bei der Bestimmung der Schilddrüsenhormone wurde jeweils ein Normalserum vom Menschen mitgemessen. Auch der Thyroxin-

basalwert ist wesentlich niedriger als beim Menschen (Tupajas: 2,8 µg/100 ml; Mensch: 8,0 µg/100 ml). Der Basalwert des Trijodthyronins liegt jedoch nicht entsprechend niedriger (Tupajas: 0,11 µg/100 ml; Mensch: 0,16 µg/100 ml).

Aus den oben genannten Gründen läßt sich jedoch aus den Gesamtkonzentrationen der Hormone im Blut nicht auf entsprechende Unterschiede in der Stoffwechselaktivität von Tupajas und Menschen schließen.

Glucocorticoide

Der Serumgehalt der Glucocorticoide zeigt bei Tupajas einen tagesperiodischen Verlauf (s. Abb. 4). Dies entspricht den Befunden an anderen Säugetieren (Krieger, 1975; Fukuda et al., 1975; Marotta et al., 1975; Lommer et al., 1976).

Auch bei kurzzeitiger Belastung steigt die Konzentration der Nebennierenrindenhormone wie erwartet innerhalb kürzester Zeit (je nach Art der Belastung) im Mittel um 200 bis 500% an (Zusammenfassung: Mason, 1972; Selye, 1976). Nur bei Kälte war der Anstieg sehr viel geringer (56%; Tab. 2). Im Gegensatz zu den anderen Situationen in denen die Tiere stärker motorisch aktiv waren, saßen sie in diesem Fall mehr oder weniger bewegungslos in ihren Schlafkästen.

Unter sozialem Dauerstress steigt die Konzentration der Glucocorticoide im Blut ebenfalls insgesamt an (Tab. 3a und 3b). Bei den Tieren der Gruppe A beginnt der Anstieg mit dem Tag der Unterwerfung (Abb. 5). Im Gegensatz dazu bleibt der Hormonspiegel der länger überlebenden Tiere der Gruppe B über Tage hinweg konstant (Abb. 5). Doch auch diese Tiere waren nach allen übrigen physiologischen Kriterien schwerstens gestresst, u.a. steigt ihr Nebennierengewicht ebenso wie bei den Tieren der Gruppe A innerhalb von 4 - 6 Tagen um mehr als 80% an und bleibt dann weitgehend konstant (s. S.19).

Dieser Befund fügt sich unseren heutigen Vorstellungen über die Reaktion der Nebennierenrinde bei Belastung nicht ein. Eine Interpretation ist jedoch ohne zusätzliche Untersuchungen über Umsatzraten und Konzentrationen der freien Anteile der Hormone nicht möglich.

Unabhängig von den unterschiedlichen Reaktionen der Tiere der Gruppen A und B ist der extreme Anstieg der Glucocorticoidspiegel im Blut auf das 10fache erstaunlich. Ob dies nur eine Zunahme der Hormone Cortisol und Corticosteron bedeutet oder auch eine Zunahme ihrer Metaboliten ist nicht zu entscheiden. Bei der Bestimmung mit der radioimmunologischen Analyse erfaßt der bindende Antikörper auch Metaboliten der Steroidhormone; diese liegen zwar normalerweise nur in sehr geringen Konzentrationen im Blut vor. Nachdem aber bei Tupajas unter soziopsychischem Stress die Nierenfunktion im allgemeinen beeinträchtigt ist, könnte die relative Konzentration der Metaboliten erhöht sein und somit die Werte verfälschen.

Schilddrüsenhormone

Die Frage nach einer tagesperiodischen Schwankung der Schilddrüsenhormonspiegel im Blut wurde mit den heutigen empfindlichen Methoden nur wenig untersucht. Der Thyroxin-gehalt im Blut männlicher Tupajas zeigt keine tagesperiodische Veränderung. Fukuda und Mitarbeiter (1975) fanden bei Ratten ebenfalls keine 24-stündige Periodik. Untersuchungen am Menschen deuten auf einen 24-Stunden Rhythmus hin (O'Connor et al., 1974; Balsam et al., 1975).

Der Trijodthyroningehalt des Blutes scheint bei Tupajas einen tagesperiodischen Verlauf zu haben (Abb. 4). Einen entsprechenden Befund kennt man vom Menschen (Balsam et al., 1975). Im Gegensatz zu Tupajas liegt beim Menschen das Maximum zu Beginn der Tagesaktivität und das Minimum zu deren Ende.

Nimmt man Tupajas Blut ab, so sind die Konzentrationen beider Schilddrüsenhormone nach einer Stunde deutlich erniedrigt ($p < 0,05$; Tab. 2). Diese Abnahme beruht vermutlich nicht auf einem erhöhten Abbau dieser Hormone, da ihre biologischen Halbwertszeiten im Gegensatz zu denen der Steroide im allgemeinen sehr hoch sind (Mensch: Thyroxin ca. 8 Tage; Trijodthyronin ca. 1 Tag). Die Abnahme läßt sich daher nur mit einem Übergang der Hormone aus dem Blutkreislauf in extravasculäres Gewebe erklären.

Auch eine Stunde nach verschiedenen Kurzzeitbelastungen ist der Serumgehalt der Schilddrüsenhormone erniedrigt (Tab.2). Vergleicht man die Konzentrationsabnahme bei Belastung mit der bei der Blutentnahme allein, so ist sie in allen Fällen geringer (außer die Trijodthyroninkonzentration beim Schwimmen); d.h.: die Konzentration der Hormone steigt relativ zur Beeinflussung durch die reine Blutentnahme an.

Diese Annahme wird durch den Befund bei mehrfacher Blutentnahme innerhalb einer halben Stunde gestützt (Abb. 3). In diesem Fall sinkt der Thyroxingehalt des Serums bis 15 Minuten deutlich ab ($p \approx 0,05$), steigt dann aber wieder an und ist nach 30 Minuten nicht mehr signifikant vom Ausgangswert verschieden.

Diese Zunahme könnte von einer vermehrten Abgabe der Hormone von der Schilddrüse herrühren; diese setzt bei einer Aktivierung durch Schilddrüsen-stimulierendes Hormon (TSH) gespeichertes Hormon frei. Dies wurde bei vielen Tierarten gezeigt (Zusammenfassung: Mason, 1972; Selye, 1976).

Andererseits könnte dieser Anstieg durch eine verringerte Bindung der Hormone im Gewebe entstehen. So hemmen z.B. die Steroide Cortison und Prednison die Aufnahme von Thyroxin in die Zellen (Blomsted und Einhorn, 1965; Kumar et al., 1968). Dagegen spricht jedoch, daß in unseren Messungen keine negative Korrelation zwischen den Konzentrationen der Glucocorticoid- und Schilddrüsenhormone besteht.

Im Gegensatz zu der relativen Zunahme der Schilddrüsenhormonspiegel unter akuter Belastung nehmen diese unter sozialem Dauerstress in allen Fällen einige Tage vor dem Tod ab (Abb. 6 Gruppe A). Nimmt man an, daß die Schilddrüse, wie Selye (1950) postuliert, keine Hormone mehr abgibt, so läßt sich die Abnahme des Trijodthyroningehaltes mit dessen kurzer biologischer Halbwertszeit erklären. Allerdings ist es keineswegs gesichert, ob die Schilddrüse tatsächlich kein Hormon mehr freisetzt.

Die Abnahme der Thyroxinkonzentration auf etwa 10% innerhalb von drei bis vier Tagen (Tab. 3a) läßt sich auf diese Weise jedoch nicht erklären. Ebenso ist eine derartig starke Verschiebung der Hormone aus dem Blut ins Gewebe nicht wahrscheinlich.

Unabhängig von diesen Fragen bleibt offen, welche stoffwechselphysiologische Konsequenz diese Änderungen der Hormonkonzentrationen im Blut haben, da wir über die freien Anteile dieser Hormone bisher keine Kenntnisse haben.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die competitive Proteinbindungsanalyse wurde für die Messung der gesamten Anteile der Glucocorticoide und des Thyroxins im Serum von Tupajas modifiziert, stellte sich jedoch als zu ungenau heraus.
2. Eine radioimmunologische Analyse zur Bestimmung der gesamten Anteile der Glucocorticoide im Serum wurde auf hohe Empfindlichkeit eingestellt (Abb. 1). Zur Messung des Thyroxin- und Trijodthyroningehaltes konnte ein radioimmunologischer Bestimmungssatz (Firma Henning, Berlin) verwendet werden, nachdem er auf höhere Empfindlichkeit eingestellt worden war (Abb. 1).
3. Die Basalwerte ($m \pm se$) von Kontrolltieren ergaben:
Glucocorticoide: $1,9 \pm 0,1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($n = 72$)
Thyroxin: $2,8 \pm 0,1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($n = 88$)
Trijodthyronin: $0,11 \pm 0,01 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($n = 92$) (Abb. 2).
4. Eine tagesperiodische Schwankung zeigt die Konzentration der Glucocorticoide im Blut und die Trijodthyroninkonzentration (Abb. 4; Tab. 1).
5. Bei verschiedenen kurzzeitigen Belastungen steigt die Konzentration der Nebennierenrindenhormone im Blut an; der Serumgehalt der Schilddrüsenhormone ist erniedrigt (Tab. 2). Relativ zur Beeinflussung durch die reine Blutentnahme allein, steigt die Konzentration der Schilddrüsenhormone in allen Fällen an (außer die Trijodthyroninkonzentration beim Schwimmen) (s.S.25 - 28; S.39).
6. Unter sozialem Dauerstress zeigen männliche Tupajas zwei unterschiedliche Reaktionsmuster. Gruppe A stirbt innerhalb weniger als sechs Tagen nach gleichmäßigem, steilem Anstieg der Glucocorticoidkonzentration und ei-

ner ebenso gleichmäßigen Abnahme des Serumgehaltes von Thyroxin und Trijodthyronin. Gruppe B lebt mehr als sechs Tage; die Konzentration der Glucocorticoide und von Trijodthyronin bleibt innerhalb der ersten Tage weitgehend konstant. Der Thyroxingehalt des Serums sinkt bereits am ersten Tag auf ca. 50% ab und bleibt dann im Mittel konstant auf diesem Wert (Tab. 3a und 3b; Abb. 5 und 6).

7. Vor- und Nachteile der competitiven Proteinbindungs- und radioimmunologischen Analyse werden herausgestellt und die Aussagekraft der Hormonbestimmungen diskutiert.
8. Die Serumspiegel der Glucocorticoid- und Schilddrüsenhormone männlicher Tupajas und ihre Veränderungen unter akutem und chronischem Stress werden diskutiert.

F. L I T E R A T U R

Balsam, A.; Leppo, L.E.:

Multifocal stimulation of the binding of iodothyronines by tissues.

J. clin. Invest. 53, 980 - 987 (1974)

Balsam, A.; Dobbs, C.R.; Leppo, L.E.:

Circadian variations in concentrations of plasma thyroxine and triiodothyronine in man.

J. appl. Physiol. 39, 297 - 299 (1975)

Blomsted, B.; Einhorn, J.:

Effect of cortisone on the peripheral degradation of ^{131}I -thyronine.

J. clin. Endocr. Metab. 25, 181 - 188 (1965)

Bronson, F.H.; Eleftheriou, B.E.:

Relative effects of fighting on bound and unbound corticosterone in mice.

Proc. Soc. exp. Biol. 118, 146 - 149 (1965)

Chopra, I.J.:

A radioimmunoassay for measurement of thyroxine in unextracted serum.

J. clin. Endocr. Metab. 34, 938 - 946 (1972)

O'Connor, J.F.; Wu, G.Y.; Gallagher, F.T.; Hellman, L.:

The 24 - hour plasma thyroxine profile in normal man.

J. clin. Endocr. Metab. 39, 765 - 771 (1974)

Doyle, G.A.:

Behavior of Prosimians

In: Behavior of non human primates, Vol.5 (Schrier, A.M.

Stollnitz, F., eds.) p. 155 - 353 Academic Press: New York 1974

Fang, V.S.; Refetoff, S.:

Radioimmunoassay for serum triiodothyronine: Evaluation of simple techniques to control interference from binding proteins.

Clin. Chem. 20, 1150 - 1154 (1974)

Farer, L.S.; Robbins, J.; Blumberg, B.S.; Rall, J.E.:

Thyroxine-serum protein complexes in various animals.

Endocrinology 70, 686 - 696 (1962)

Farmer, R.W.; Pierce, Ch.E.:

Plasma cortisol determination: Radioimmunoassay and competitive protein binding compared.

Clin. Chem. 20, 411 - 414 (1974)

Fukuda, H.; Greer, M.A.; Roberts, L.; Allen, C.F.;

Critchlow, V.; Wilson, M.:

Nyctohemeral and sex-related variations in plasma thyrotropin, thyroxine and triiodothyronine.

Endocrinology 97, 1424 - 1432 (1975)

Hefco, E.; Krulich, L.; Illner, P.; Larsen, P.R.:

Effect of acute exposure to cold on the activity of hypothalamic-pituitary-thyroid system.

Endocrinology 97, 1185 - 1195 (1975)

v. Holst, D.:

Sozialer Stress bei Tupajas (*Tupaia belangeri*).

Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems und ihre Beziehung zu hormonal ausgelösten ethologischen und physiologischen Veränderungen.

Z. vergl. Physiol. 63, 1 - 58 (1969)

v. Holst, D.:

Renal failure as the cause of death in *Tupaia belangeri* exposed to persistent social stress.

J. comp. Physiol. 78, 236 - 273 (1972)

Horn, K.; Henner, J.; Müller, O.A.; Scriba, P.C.:
Mechanisierte Hormon - Analytik mittels simultaner Säulen-
chromatographie.

Z. Klin. Chem. Biochem. 13, 173 - 177 (1975)

Jobin, M.; Ferland, L.; Labrie, F.:

Effect of pharmacological blockade of ACTH and TSH secretion on the acute stimulation of prolactin release by exposure to cold and ether stress.

Endocrinology 99, 146 - 151 (1976)

Keane, P.M.; Walker, W.H.C.; Gauldie, J.; Abraham, G.E.:
Thermodynamic aspects of some radioassays.

Clin. Chem. 22, 70 - 73 (1976)

Krieger, D.T.:

Rhythms of ACTH and Corticosteroid secretion in health and disease, and their experimental modification.

J. Steroid. Biochem. 6, 785 - 791 (1975)

Kumar, R.S.; Musa, B.U.; Appleton, W.G.; Dowling, J.T.:

Effect of prednisone on thyroxine distribution.

J. clin. Endocr. Metab. 28, 1335 - 1340 (1968)

Lommer, D.; Distler, A.; Nast, H.P.; Sinterhauf, K.;

Walter, U.; Wolff, H.P.; Sieler, K.:

Tagesprofile von Plasmaaldosteron, -Cortisol, -Renin, -Angiotensin und Angiotensinasen bei Normalpersonen.

Klin. Wschr. 54, 123 - 130 (1976)

Marotta, S.F.; Hiles, L.G.; Lanuza, D.M.; Boonayathap, U.:

The relation of hepatic in vitro inactivation of corticosteroids to the circadian rhythm of plasma corticosteron

Horm. Metab. Res. 7, 334 - 337 (1975)

Mason, J.W.:

Organisation of psychoendocrine mechanisms.

In: Handbook of Psychophysiology (Greenfield, N.S.; Sternbach, R.A.; eds.) p. 3 - 76 Holt, Rinehart and Winston: New York 1972

van Middlesworth, L.:

Metabolism and excretion of thyroid hormones.

In: Handbook of physiology, Endocrinology, Vol.III Thyroid
(Greep, R.O.; Astwood, E.B.; Greer, M.A.; Solomon, D.H.;
Geiger, S.B.;eds.) p. 215 - 231 American Physiological
Society: Washington 1974

Müller, O.A.; Braun, J.; Fröhlich, R.; Scriba, P.C.:

Eine mechanisierte kompetitive Proteinbindungsanalyse für
Cortisol im Serum ohne vorherige Extraktion mit organischen
Lösungsmitteln.

Z. Klin. Chem. Biochem. 12, 276 - 278 (1974)

Nagata, H.; Izumiyama, K.; Kamata, K.; Kon, S.;

Yukimura, Y.; Tawata, M.; Aizawa, T.; Yamada, T.:

An increase of plasma triiodothyronine concentration in man
in cold environment.

J. clin. Endocr. Metab. 43, 1153 - 1157 (1976)

Nieschlag, E.; Wickings, E.J.:

A review of radioimmunoassay for steroids.

Z. Klin. Chem. Biochem. 13, 261 - 271 (1975)

Pfannenstiel, L.P.:

Diagnostik von Schilddrüsenerkrankungen.

Byk - Mallinckrodt: Dietzenbach - Steinberg 1974

Raith, L.:

Einführung in radioimmunologische Methoden.

Byk - Mallinckrodt: Dietzenbach - Steinberg 1975

Refetoff, S.; Robin, N.I.; Fang, V.S.:

Parameters of thyroid function in serum of 16 vertebrate
species: A study of PBI, Serum-T₄, free T₄ and the pattern
of T₄ and T₃ binding to serum proteins.

Endocrinology 86, 793 - 805 (1970)

Rodbard, D.:

Statistical quality control and routine data processing
for radioimmunoassays and immunoradiometric assays.

Clin. Chem. 20, 1255 - 1270 (1974)

Selye, H.:

The physiology and pathology of exposure to stress.

Acta: Montreal 1950

Selye, H.:

Stress in health and disease.

Butterworths: Boston 1976

Seth, J.; Rutherford, F.J.; McKenzie, I.:

Solid-phase radioimmunoassay of thyroxine in unextracted
serum.

Clin. Chem. 21, 1406 - 1413 (1975)

Sterling, K.:

The nature of iodine in plasma.

In: Handbook of physiology, Endocrinology, Vol.III Thyroid

(Greep, R.O.; Astwood, E.B.; Greer, M.A.; Solomon, D.H.

Geiger, S.R.; eds.) p. 179 - 185 American Physiological

Society: Washington 1974

Tal, E.; Chayoth, R.; Zor, U.; Goldhaber, G.; Zerachie, A.:

Pituitary-thyroid interrelationship in rats exposed to dif-
ferent environmental temperatures.

Acta Endocr. 83, 99 - 104 (1976)

Tanabe, Y.; Ishii, T.; Tamaki, Y.:

Comparison of thyroxine-binding plasma proteins of verte-
brates and their evolutionary aspects.

Gen. Comp. Endocr. 13, 14 - 21 (1969)

Wilson, O.; Hedner, P.; Laurell, S.; Nosslin, B.;

Rerup, C.; Rosengren, E.:

Thyroid and adrenal response to acute cold exposure in man.

J. appl. Physiol. 28, 543 - 548 (1970)

Woeber, K.A.; Ingbar, S.H.:

Interactions of thyroid hormones with binding proteins.

In: Handbook of physiology, Endocrinology, Vol.III Thyroid

(Greep, R.O.; Astwood, E.B.; Greer, M.A. Solomon, D.H.;

Geiger, S.R.; eds.) p. 187 - 196 American Physiological

Society: Washington 1974

Zettner, A.:

Principles of competitive binding assays (saturation
analysis). I. Equilibrium techniques

Clin. Chem. 19, 699 - 705 (1973)

LEBENS LAUF

Am 25. April 1947 wurde ich in Mechernich als Tochter des Apothekers Karl-Theodor Düren und seiner Frau Else, geb. Meyer, geboren. Nach vier Jahren Volksschule in Mechernich besuchte ich das neusprachliche Gymnasium in Euskirchen. Dort legte ich am 15. Februar 1966 das Abitur ab. Meine zweijährige Praktikantenzeit in der Schlink'schen Apotheke in Schleiden beendete ich mit dem pharmazeutischen Vor-examen am 19. März 1968. An der Universität München belegte ich zwei Semester Biologie und begann im Sommersemester 1969 mit dem Studium der Pharmazie. Am 28. April 1972 legte ich das pharmazeutische Staatsexamen ab und erhielt dann meine Approbation als Apotheker. Anschließend absolvierte ich am Zoologischen Institut der Universität München mehrere Kurse und begann Ende 1973 mit den Arbeiten zu meiner Dissertation.

